

Dissertation

Isoform-spezifische Funktionen mitogen-aktivierter Proteinkinasen in Transkriptionskontrolle und Proliferation
-ein integrierter Ansatz mittels RNA Interferenz und Mikroarray Analysen-

zur Erlangung des akademischen Grades Doctor rerum naturalium

Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät I

Anja Schramme

Dekan: Prof. Doktor Andreas Herrmann

Gutachter: 1. Prof. Doktor Reinhold Schäfer
2. Prof. Doktor Hans-Peter Herzel
3. Prof. Doktor Wolfgang Dubiel

eingereicht: 14.08.2006

Datum der Promotion: 13.12.2006

Zusammenfassung

In vielen humanen Neoplasien findet sich eine erhöhte Aktivität des Raf-Mek-Erk-Signaltransduktionsweges. Zunächst wurde davon ausgegangen, dass diese erhöhte Aktivität hauptsächlich durch die Ras-Onkogene hervorgerufen wird. Doch mittlerweile konnten auch Mutationen der Raf Gene in humanen Neoplasien nachgewiesen werden. Gegen Raf und Mek konnten eine Anzahl von Enzyminhibitoren entwickelt werden. Der Nachteil vieler dieser Inhibitoren ist, dass sie nicht zwischen den einzelnen Kinaseisoformen unterscheiden können. In dieser Arbeit ist es nun das erste Mal gelungen, jede Komponente des Raf-Mek-Erk-Signaltransduktionsweges einzeln mittels RNA Interferenz effizient zu inhibieren. Dabei konnte die Rolle der verschiedenen Isoformen in der Proliferation, Morphologie und Genexpression von transformierten Zellen definiert werden.

In den NIH3T3-pEJ Zellen konnte A-Raf erstmals eine antiapoptotische Rolle zugewiesen werden. Diese Hemmung der Apoptose läuft möglicherweise über einen Mek2-abhängigen Weg und ist an die Mitochondrien gekoppelt. Für die beiden Mek Kinasen konnten unterschiedliche Funktionen in der Signalweiterleitung gezeigt werden. Mek2 spielt die Hauptrolle in der Aktivierung der beiden Substratkinasen Erk1 und Erk2. Der Verlust der Mek1 Isoform wird dagegen möglicherweise durch eine erhöhte Expression von Mek2 kompensiert und wirkt sich nicht so stark auf die Phosphorylierung von Erk1/2 aus. Durch die Verwendung von Erk1 und Erk2 spezifischen siRNAs konnte eine Trennung zwischen der Proliferationsregulation und der Kontrolle der morphologischen Transformation herausgearbeitet werden. Durch die Verwendung von Mikroarrays ist es gelungen, beiden Phänotypen ein Genexpressionsprofil zuzuordnen. Neben Unterschieden zwischen den verschiedenen Kinaseisoformen konnten neue, potentielle Feedbacks beschrieben werden.

Schlagwörter: RNA-Interferenz, Raf-Mek-Erk-Signaltransduktionsweg, Ras-vermittelte Transformation, Mikroarrays

Abstract

In many human neoplasia an increased activity of the RAF/MEK/ERK- signaling pathway is found. First it was assumed that this raised activity is caused primarily by the RAS oncogenes. However, meanwhile mutations in the RAF genes could be also proved in human neoplasia. A number of enzyme inhibitors have been developed against the RAF and MEK proteins. The disadvantage of many of these inhibitors is that they cannot distinguish between the different kinase isoforms. In this work it has succeeded the first time to inhibit every component of the RAF/MEK/ERK- signaling pathway individually by means of interference RNA. Beside this, the role of the different isoforms in the proliferation, morphology and genetic profile of transformed cells could be defined.

For the first time A-Raf could be assigned an anti-apoptotic role in NIH3T3-pEJ cells. This inhibition of the apoptosis possibly runs through a Mek2-dependent way and is coupled to the mitochondria. For both Mek kinases different functions could be shown in the downstream signaling. Mek2 plays the leading role in the activation of both downstream kinases Erk1 and Erk2. The loss of the Mek1 isoform expression is possibly compensated through an increased expression of Mek2 and does not affect the phosphorylation of Erk1 / 2 so strongly. A discrimination between the regulation of proliferation and the control of the morphological transformation could be worked out by the use of Erk1 and Erk2 specific siRNAs. By the use of micorarray an expression profile of both phenotypes has assigned. Beside differences between the different kinases new, potential feedback pathways could be described.

Key words: RNA interference, Raf-Mek-Erk signaling pathway, Ras-mediated transformation, microarrays

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung.....	II
Abstract.....	III
Abkürzungsverzeichnis.....	VIII
Abbildungsverzeichnis	XI
1 Einleitung.....	1
1.1 Die Ras Proteine und die Transformation von Säugetierzellen	1
1.2 Die Komponenten des Raf-Mek-Erk-Signaltransduktionsweges besitzen unterschiedliche Funktionen in Regulation von Transformation und Proliferation	4
1.3 Bedeutung von Ras-Zielgenen für die Ausprägung des transformierten Phänotyps.....	8
1.4 Hemmung der Genexpression mittels RNA Interferenz	10
1.5 Ziel der Arbeit.....	14
2 Material und Methoden.....	15
2.1 Material.....	15
2.1.1 Chemikalien.....	15
2.1.2 Chemisch synthetisierte siRNAs	15
2.1.3 DNA-Oligonukleotide zur Herstellung von siRNA-Duplexen mittels reverser Transkription.....	17
2.1.4 siRNA Duplexe (synthetisiert von Dr. Matthias Truss im Labor für funktionelle Genomanalyse der Charite)	18
2.1.5 Primer für die RT-PCR.....	19
2.1.6 Kits	20
2.1.7 Antikörper	21
2.1.8 Zelllinien	22
2.2 Methoden.....	22
2.2.1 siRNA Herstellung.....	22
2.2.2 Zellkultur- allgemeine Techniken	24
2.2.3 Arbeiten mit RNA.....	27
2.2.4 Arbeiten mit Proteinen	32
3 Ergebnisse	40
3.1 Die Inhibition von HRAS-V12 durch siRNAs führt zu einem G1 Zellzyklus Arrest.....	40
3.1.1 Design der siRNA Duplexe.....	40

3.1.2	Analyse der Ras Expression nach Transfektion mit siRNA-Duplexen spezifisch gegen HRAS-V12	42
3.1.3	Die siRNA vermittelte Inhibition von HRAS-V12 führt in den Zelllinien NIH3T3-pEJ, FE-8 und EJ zu einer starken Reduktion des Zellwachstums	46
3.1.4	Die Inhibition des HRAS-V12 Proteins resultiert in einer erhöhten Anzahl von Zellen in der G1-Phase des Zellzyklus	47
3.1.5	Einfluss der HRAS-V12 Inhibition auf die Zellmorphologie	49
3.1.6	Das HRAS-V12 Onkogen ist für das verankerungsunabhängige Wachstum in NIH3T3-pEJ notwendig	50
3.1.7	Die Inhibition des HRAS-V12 Proteins hat nur geringe Auswirkungen auf nachgeschaltete Signalwege.....	51
3.2	<i>A-RAF, B-RAF und c-Raf-1 üben isoform-spezifische Funktionen in der Kontrolle des Zellwachstums und in der Weiterleitung des Ras Signals aus.....</i>	55
3.2.1	Raf-Isoform spezifische RNA Interferenz	55
3.2.2	Die Raf-Isoformen spielen unterschiedliche Rollen in der Kontrolle des Zellwachstums	58
3.2.3	Die Inhibition der A-Raf oder der c-Raf-1 Expression resultiert in einem Verlust des verankerungsunabhängigen Wachstums von NIH3T3-pEJ Zellen	59
3.2.4	Die Raf-Isoformen haben unterschiedliche Effekte auf die Morphologie von NIH3T3-pEJ Zellen.....	60
3.2.5	C-Raf-1 hat eine wichtige Funktion in der Aktivierung der Substratkinasen Mek1/2	61
3.2.6	NIH3T3-pEJ Zellen exprimieren spezifische Spleißvarianten von B-Raf.....	62
3.2.7	Die Inhibition der A-Raf oder c-Raf-1 Isoform führt zur Apoptose in NIH3T3-pEJ Zellen	66
3.2.8	Aktivierte Raf Kinasen kooperieren in der Kontrolle der morphologischen Transformation.....	68
3.3	<i>Die Kinasen Mek1 und Mek2 haben unterschiedliche Rollen in der Regulation der Zellproliferation und in der Aktivierung ihrer Substratkinasen Erk1 und Erk2</i>	72
3.3.1	Die Inhibition der Mek2 Isoform hemmt das Wachstum von NIH3T3-pEJ Zellen.....	75
3.3.2	Das verankerungsunabhängige Wachstum der NIH3T3-pEJ Zellen wird durch die Inhibition der Mek2 Isoform vollständig gestoppt	77
3.3.3	Die gleichzeitige Inhibition von Mek1 und Mek2 resultiert in einer Reversion des transformierten Phänotyps.....	78
3.3.4	Das Ausschalten der Mek2 Isoform führt zu einer erhöhten Anzahl von Zellen in der G1 Phase des Zellzyklus	79

3.3.5	Mek2 hat eine dominante Rolle in der Aktivierung der Substratkinasen Erk1 und Erk2	80
3.3.6	Die Aktivierung von Mek2 spielt eine Rolle in der Stimulation von PKC.....	83
3.3.7	Der Einfluss der beiden Mek Isoformen auf die Aktivierung von potentiellen Zielproteinen.....	85
3.4	<i>Erk1 und Erk2 kontrollieren gemeinsam die Ausprägung des transformierten Phänotyps</i>	87
3.4.1	Die effiziente Inhibition der Erk1 und Erk2 Kinasen durch RNA Interferenz	87
3.4.2	Isoform-spezifische Funktionen von Erk1 und Erk2 in der Kontrolle des Zellwachstums	90
3.4.3	Das verankerungsunabhängige Wachstum der HRAS-transformierten Zellen basiert auf der Aktivität beider Erk Kinasen	92
3.4.4	Die Aktivität beider Erk Kinasen ist für die morphologische Transformation nötig	92
3.4.5	Der Einfluss der beiden Erk Kinasen auf die Expression verschiedener Zielproteine	93
3.5	<i>Untersuchung einer möglichen Interferon-Antwort durch die Transfektion von siRNA Duplexen in NIH3T3-pEJ Zellen.....</i>	97
3.5.1	Die Transfektion des Polymers PolyIC führt zur Induktion einer Interferon-Antwort	97
3.5.2	Die Transfektion von siRNA Duplexen in NIH3T3-pEJ Zellen löst keine Interferon-Antwort aus.....	99
3.6	<i>Einfluss der unterschiedlichen Komponenten des Raf-Mek-Erk-Signaltransduktionsweges auf die Expression Ras-regulierter Gene.....</i>	101
3.6.1	Die simultane Hemmung von Mek1 und Mek2 oder Erk1 und Erk2 hat den größten Einfluss auf das Genexpressionsprofil in den NIH3T3-pEJ Zellen.....	101
UU	106
3.6.2	Effekte der Ornithinedecarboxylase- und Cyclin D1-Inhibition in NIH3T3-pEJ Zellen	122
3.7	<i>Untersuchung von Ras regulierten Genen in den Rattenzelllinien FE-8 und Rose199-A2/5</i>	127
3.7.1	Die Inhibition des Myb-bindenden Proteins P160 und des transkriptionellen Koaktivators p105 führt zu einer Hemmung der Proliferation von FE-8 Zellen	127
3.7.2	Die Inhibition von Fra-1 und HMGI-C hat einen starken Einfluss auf die Proliferation von Rose199 A2/5 Zellen.....	129
3.8	<i>Unerwartete Effekte der siRNA Inhibition von ETF in 208F Zellen.....</i>	134
3.8.1	ETF/Tead2 spielt eine Rolle in der morphologischen Transformation von 208F Zellen	135

3.8.2	Einfluss des ETF/TEad2 Genes auf die Proliferation von 208F Zellen	137
3.8.3	Der Verlust von ETF/Tead2 spielt eine Rolle in der Aktivierung von Erk1/2.....	138
3.9	<i>siRNA Design</i>	139
4	Diskussion	142
4.1	<i>siRNA versus Inhibitor-Spezifität kontra Effizienz: die Vor- und Nachteile unterschiedlicher Methoden der Signalweg-Hemmung</i>	<i>142</i>
4.2	<i>Neue spezifische Funktionen für einzelne Komponenten des Raf-Mek-Erk-Signaltransduktionsweges</i>	<i>144</i>
4.2.1	A-Raf: weitgehend unbekannte Rolle in der Suppression der Apoptose in Ras-transformierten Zellen	144
4.2.2	Mek1 und Mek2: zwei unterschiedliche Kinasen mit verschiedenen Rollen in der Proliferation und Erk1,2 Stimulation.....	149
4.2.3	Erk1 und Erk2: gleichzeitige Aktivierung is essentiell für die morphologische Transformation.....	154
4.3	<i>Charakterisierung von potentiellen Kandidatengenen, die in der Ras-vermittelten morphologischen Transformation eine Rolle spielen.....</i>	<i>156</i>
4.4	<i>Fra-1 spielt eine wichtige Rolle in der Regulation der Proliferation.....</i>	<i>158</i>
	Literaturverzeichnis.....	161
	Anhang	194
	Danksagung.....	197
	Erklärung	198

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Abb.	Abbildung
AP-1	Aktivierendes Protein A
APS	Ammonium Persulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Bovines Serumalbumin
C	Cytosin
DNA	Deoxyribonucleic acid
dsRNA	Doppelsträngige Ribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermal growth factor
EGFP	Enhanced green fluorescent protein
Erk	Extracelular signal-regulated protein kinase
EST	Expressed sequence tag
G	Guanin
GAP	GTPase-aktivierendes Protein
Gas1	Growth arrest specific 1
GDP	Guanosindiphosphat
GTP	Guanosintriphosphat
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonsäure
HMGI-C	High mobility group protein isoform I-C
Hsp70	Hitzeschockprotein 70

MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MAPKAP kinase 2	Mitogen-aktivierte Proteinkinase-aktivierende Proteinkinase
miRNA	MikroRNA
Mnk	Mitogen-aktivierte Proteinkinase-interagierende Kinase
OD	Optische Dichte
OdcI	Ornithinedecarboxylase I
PARP	poly(ADP-ribose)-polymerase-1
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
PDGF	Platelet derived growth factor
PI3K	Phosphoinositid 3-Kinase
PKC	Proteinkinase C
PKR	Proteinkinase R
PMSF	Phenyl Methyl- Sulfonyl Fluorid
PolyHEMA	Poly-2-hydroxyethyl Methacrylate
RISC	RNA induced silencing complex
RNA	Ribonucleic acid
RNAi	RNA Interferenz
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse transcriptase- polymerase chain reaction
SDS	Sodiumdodecylsulfat
siRNA	Small-interfering RNA
SSC	Sodiumchloridsodiumcitrat
STAT	Signal transducer and activator of transcription
T	Thymin

TBST	Trisgepufferte Saline Tween-20
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine
TGF α	Transforming growth factor alpha
U	Uracil
Ü.N.	Über Nacht
VEGF	Vascular endothelial growth factor

Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1:ÜBERSICHT RAS-REGULierter SIGNALTRANSDUKTIONSWEGE.....	2
ABBILDUNG 2:SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DES RAF-MEK-ERK-SIGNALTRANSDUKTIONSWEGES	5
ABBILDUNG 3: MECHANISMUS DER RNA INTERFERENZ.....	12
ABBILDUNG 4: TEILSEQUENZ DER mRNA UND DES PROTEINS FÜR DAS HUMANE HRAS-V12 UND HRAS-WT	41
ABBILDUNG 5: POSITION DER BASENAUSTAUSCHE IN DEN HRAS-V12-SPEZIFISCHEN siRNAs	41
ABBILDUNG 6: WESTERNBLOT ANALYSE DER RAS EXPRESSION IN NIH3T3-PEJ ZELLEN	43
ABBILDUNG 7: WESTERNBLOT ANALYSE DER RAS EXPRESSION IN FE-8 ZELLEN.	44
ABBILDUNG 8: WESTERNBLOT ANALYSE DER RAS EXPRESSION IN HUMANEN EJ ZELLEN	45
ABBILDUNG 9:EINFLUSS VON 2 BASENAUSTAUSCHEN AUF DIE EFFIZIENZ VON siRNAs.	46
ABBILDUNG 10: EFFEKTE DER RAS INHIBITION AUF DIE ZELLZAHL VON NIH3T3-PEJ, FE-8 UND EJ ZELLEN	47
ABBILDUNG 11: DNA-GEHALT VON NIH3T3-PEJ ZELLEN NACH INHIBITION DER RAS EXPRESSION	48
ABBILDUNG 12: MORPHOLOGIE DER NIH3T3-PEJ ZELLEN NACH INHIBITION DER RAS EXPRESSION.....	50
ABBILDUNG 13: VERANKERUNGSUNABHÄNGIGES WACHSTUMS VON NIH3T3-PEJ ZELLEN NACH TRANSFEKTION MIT HRAS-V12 SPEZIFISCHEN siRNA DUPLEXEN	51
ABBILDUNG 14: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER IN DER RAS-VERMITTELTEN TRANSFORMATION REGULIERTEN SIGNALTRANSDUKTIONSWEGE	52
ABBILDUNG 15: EINFLUSS VON HRAS-V12 SPEZIFISCHEN siRNA DUPLEXEN AUF DIE AKTIVIERUNG DER BEIDEN KINASEN ERK1 UND ERK2.....	53
ABBILDUNG 16:WESTERNBLOT ANALYSE DER RAL1 EXRESSION NACH INHIBITION DER RAS EXPRESSION	54
ABBILDUNG 17: ZUSAMMENFASSENDE DARSTELLUNG DER MITTELS HRAS-V12-SPEZIFISCHEN siRNA DUPLEXEN ERHALTENEN ERGEBNISSE.....	55
ABBILDUNG 18: INHIBITION DER A-RAF, B-RAF UND C-RAF-1 mRNA EXPRESSION DURCH ISOFORMSPEZIFISCHE siRNA DUPLEXE	56
ABBILDUNG 19: WESTERNBLOT ANALYSE DER C-RAF-1 EXPRESSION.....	57
ABBILDUNG 20: EINFLUSS DER DREI RAF-ISOFORMEN AUF DIE ZELLZAHL VON NIH3T3-PEJ ZELLEN	58
ABBILDUNG 21: UNTERSCHIEDLICHER EINFLUSS DER DREI RAF-ISOFORMEN AUF DIE PROLIFERATION.....	59
ABBILDUNG 22: VERANKERUNGSUNABHÄNGIGES WACHSTUM VON NIH3T3-PEJ ZELLEN NACH INHIBITION DER DREI RAF-ISOFORMEN	60
ABBILDUNG 23: EFFEKTE DER RAF ISOFORMEN AUF DIE MORPHOLOGIE VON NIH3T3-PEJ ZELLEN	61
ABBILDUNG 24: WESTERNBLOT ANALYSE DER AKTIVIERUNG VON MEK1/2 UND ERK1/2 NACH INHIBITION DER RAF ISOFORMEN.	62
ABBILDUNG 25: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER EXONSTRUKTUR DER 4 VERSCHIEDENEN B-RAF SPLICEVARIANTEN	63
ABBILDUNG 26: NACHWEIS DER IN DEN NIH3T3-PEJ ZELLEN EXPRIEMIERTEN B-RAF SPLICEISOFORMEN MITTELS RT-PCR....	64
ABBILDUNG 27: VERIFIZIERUNG DER IN DEN NIH3T3-PEJ ZELLEN EXPRIEMIERTEN B-RAF-ISOFORMEN	65
ABBILDUNG 28: EFFEKTE DER GEGEN DIE BEIDEN ALTERNATIVEN EXONS GERICHTETEN siRNA DUPLEXE AUF DIE mRNA EXPRESSION VON B-RAF	65
ABBILDUNG 29: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER AKTIVIERUNG VON APOPTOSE-SIGNALKASKADEN.....	67
ABBILDUNG 30: WESTERN BLOT ANALYSE DER WICHTIGESTEN AKTIVATOREN UND EFFEKTOREN DER APOPTOSE.	68

ABBILDUNG 31: EINFLUSS DER INHIBITION ZWEIER RAF-ISOFORMEN AUF DIE MORPHOLOGIE VON NIH3T3-PEJ ZELLEN	69
ABBILDUNG 32: WESTERNBLOT ANALYSE DER ERK1/2 AKTIVIERUNG NACH SIMULTANER INHIBITION ZWEIER RAF-ISOFORMEN	70
ABBILDUNG 33: ZUSAMMENFASSUNG DER FUNKTIONEN VON A-RAF, B-RAF UND C-RAF-1 IN NIH3T3-PEJ ZELLEN.....	71
ABBILDUNG 34: NACHWEIS DER INHIBITION DER MEK1 UND MEK2 EXPRESSION DURCH ISOFORMSPEZIFISCHE siRNA DUPLEXE.....	73
ABBILDUNG 35: WESTERNBLOT ANALYSE DER INHIBITION VON MEK1 UND MEK2 DURCH ZUSÄTZLICHE siRNA DUPLEXE....	74
ABBILDUNG 36: DARSTELLUNG DER RELATIVEN ZELLZAHL NACH INHIBITION VON MEK1 UND MEK2.....	75
ABBILDUNG 37: AUSWIRKUNGEN DER MEK1 UND MEK2 HEMMUNG AUF DIE PROLIFERATION.....	76
ABBILDUNG 38: VERANKERUNGSUNABHÄNGIGES WACHSTUM VON NIH3T3-PEJ ZELLEN NACH INHIBITION VON MEK1 UND MEK2	77
ABBILDUNG 39: MORPHOLOGISCHE EFFEKTE DER HEMMUNG VON MEK1 UND MEK2.....	78
ABBILDUNG 40: WESTERNBLOT ANALYSE DER PHOSPHO-MEK1/2 UND PHOSPHO-ERK1/2 EXPRESSION NACH TRANSFEKTION VON MEK1/2 SPEZIFISCHEN siRNA DUPLEXEN	81
ABBILDUNG 41: ANALYSE DER KERNSTÄNDIGEN UND CYTOPLASMATISCHEN LOKALISATION VON PHOSPHO-MEK1/2 UND PHOSPHO-ERK1/2 NACH INHIBITION DER MEK1 UND MEK2 EXPRESSION	82
ABBILDUNG 42: AKTIVIERUNG VON PKC ISOFORMEN DURCH DIE HEMMUNG VON MEK1 UND MEK2	84
ABBILDUNG 43: EINFLUSS VON MEK1,2 AUF DIE AKTIVIERUNG POTENTIELLER ZIELPROTEINE.....	85
ABBILDUNG 44: SCHEMATISCHE ZUSAMMENFASSUNG DER FÜR MEK1 UND MEK2 ERHALTENEN ERGEBNISSE.....	87
ABBILDUNG 45: NACHWEIS DER EFFIZIENZ VON ERK1 UND ERK2 SPEZIFISCHEN siRNA DUPLEXEN	89
ABBILDUNG 46: WESTERNBLOT ANALYSE DER ERK1/2 EXPRESSION NACH TRANSFEKTION VON ERK1/2 siRNAs.....	90
ABBILDUNG 47: GRAPHISCHE DARSTELLUNG DER RELATIVEN ZELLZAHL NACH INHIBITION VON ERK1 UND ERK2	91
ABBILDUNG 48: BESTIMMUNG DES ZWEIDIMENSIONALEN WACHSTUMS VON NIH3T3-PEJ ZELLEN NACH HEMMUNG DER ERK1 UND ERK2 EXPRESSION	91
ABBILDUNG 49: VERANKERUNGSUNABHÄNGIGES WACHSTUM NACH AUSSCHALTUNG DER BEIDEN ERK KINASEN	92
ABBILDUNG 50: EINFLUSS DER BEIDEN ERK KINASEN AUF DIE MORPHOLOGIE DER NIH3T3-PEJ ZELLEN.....	93
ABBILDUNG 51: EXPRESSION VERSCHIEDENER ZIELPROTEINE NACH INHIBITION VON ERK1 UND ERK2.....	94
ABBILDUNG 52: ZUSAMMENFASSUNG DER ERHALTENEN DATEN FÜR ERK1 UND ERK2.	96
ABBILDUNG 53: UNTERSUCHUNG EINER MÖGLICHEN INTERFERONANTWORT DURCH DIE TRANSFEKTION DES POLYMERS POLYIC.....	98
ABBILDUNG 54: WESTERNBLOT ANALYSE VON p3IF2 α UND STAT1 NACH APPLIKATION VERSCHIEDENER siRNAs	100
ABBILDUNG 55: INHIBITION DER CYCLIN D1 EXPRESSION DURCH SPEZIFISCHE siRNA DUPLEXE.....	123
ABBILDUNG 56: EINFLUSS DER HEMMUNG VON CYCLIN D1 AUF DIE MORPHOLOGIE VON NIH3T3-PEJ ZELLEN.....	123
ABBILDUNG 57: BESTIMMUNG DER RELATIVEN ZELLZAHL NACH APPLIKATION VON CYCLIN D1 SPEZIFISCHEN siRNAs	124
ABBILDUNG 58: UNTERSUCHUNG DER EFFIZIENZ ODC-SPEZIFISCHER siRNA DUPLEXE	124
ABBILDUNG 59: MORPHOLOGIE VON NIH3T3-PEJ ZELLEN NACH INHIBITION DER ODC EXPRESSION.	125
ABBILDUNG 60: GRAPHISCHE DARSTELLUNG DER ZELLZAHL NACH HEMMUNG DER ODC-EXPRESSION	126
ABBILDUNG 61: NACHWEIS DER FUNKTIONALITÄT VON siRNAs SPEZIFISCH GEGEN BARD1, P160, NF-1 UND P105	128
ABBILDUNG 62: EINFLUSS VON BARD1, P160, NF-1 UND P105 AUF DAS WACHSTUM VON Fe-8 ZELLEN	129
ABBILDUNG 63: NACHWEIS DER EFFIZIENZ VON NAB-1 UND FRA-1 SPEZIFISCHEN siRNAs.	130

ABBILDUNG 64: RT-PCR ANALYSE DER HMGI-C, EI24 UND GADD153 EXPRESSION NACH TRANSFEKTION VON siRNA DUPLEXEN.....	131
ABBILDUNG 65: EINFLUSS VON FRA-1 UND KRAS-V12 AUF DIE ZELLZAHL VON ROSE A2/5 ZELLEN	132
ABBILDUNG 66: UNTERSUCHUNG DES ZWEI- UND DREIDIMENSIONALEN WACHSTUMS NACH APPLIKATION VON siRNAs SPEZIFISCH GEGEN GADD153, EI24, HMGI-C UND NAB1.....	133
ABBILDUNG 67: NACHWEIS DER FUNKTIONALITÄT DER ETF/TEAD2 SPEZIFISCHEN siRNA.....	135
ABBILDUNG 68: EFFEKTE DER ETF/TEAD2 HEMMUNG AUF DIE MORPHOLOGIE VON 208F ZELLEN	136
ABBILDUNG 69: EINFLUSS VON ETF/TEAD2 AUF DIE PROLIFERATION VON 208F ZELLEN	137
ABBILDUNG 70: EXPRESSION VON PHOSPHO-ERK1/2 NACH APPLIKATION VON ETF/TEAD2 SPEZIFISCHEN siRNAs.....	138

1 Einleitung

1.1 Die Ras Proteine und die Transformation von Säugetierzellen

Das Säugetiergenom besitzt drei Ras-Gene, die für vier unterschiedliche Ras-Proteine H-Ras, N-Ras, K-Ras2A (K-Ras4A) und K-Ras2B (K-Ras4B) kodieren {Barbacid, 1987 #1} {Lowy, 1993 #2}. Die Expression der Ras-Proteine ist ubiquitär, allerdings geben mRNA Daten Hinweise auf gewebespezifische Unterschiede zwischen den drei Ras-Genen. Das H-Ras Gen zeigt eine starke Expression in Haut- und Muskelzellen, während K-Ras verstärkt im Dickdarm und im Thymus nachgewiesen werden konnte {Lowy, 1993 #2}. Dagegen wird N-Ras vorzugsweise in männlichen Keimzellen und im Thymus exprimiert {Lowy, 1993 #2}.

Die Ras-Gene kodieren für Membran-assoziierte, kleine GDP/GTP-bindende Proteine. In normalen, ruhenden Zellen liegen über 99% dieser Proteine im inaktiven, GDP-gebundenen Zustand vor {Malumbres, 1998 #145}. Bindet ein Wachstumsfaktor (z.B. EGF oder PDGF) an seinen Rezeptor, kommt es am intrazellulären Teil des Rezeptors zur Aktivierung verschiedener Adapter- und GDP/GTP-Austausch Proteine (SOS, Shc, Grb2). Der Austausch des Ras-gebundenen GDP zu GTP führt zur Aktivierung von Ras {Ehrhardt, 2002 #57} {Reuther, 2000 #195}. Bei der Inaktivierung, d.h. bei der Hydrolyse von GTP zu GDP, spielen GTPase-aktivierende Proteine (GAPs), unter anderem p120-GAP und NF1-GAP eine essentielle Rolle, weil sie die schwache intrinsische GTPase-Aktivität von Ras auf das erforderliche Maß verstärken {Bourne, 1990 #22} {Malumbres, 1998 #145}. Die Ras Aktivierung bewirkt außerdem die Stimulation einer ganzen Anzahl von Effektorproteinen, darunter die Serin/Threonin Kinase Raf, Mitglieder der RalGDS Familie, die PI3 Kinase, PKC ζ und Mitglieder der Rho-Familie (Abbildung 1) {Campbell, 1998 #30}. Über das komplexe Netzwerk seiner Effektorwege besitzt Ras Einfluss auf eine Vielzahl essentieller Zellprozesse. Neben seiner zentralen Funktion als Proliferations- und Zellzykluspromoter {Marshall, 1999 #151} steuert Ras unter anderem die Differenzierung {Crespo, 2000 #44}, die Apoptose {Downward, 1998 #53}, die Organisation des Zytoskeletts {Nobes, 1995 #171} und die Modulation der Translation und Transkription {Gingras, 1999 #72} {Polunovsky, 2000 #188} {Malumbres, 1998 #145} {Shields, 2000 #223} {Zuber, 2000 #291} {Tchernitsa, 2004 #244}.

Darüber hinaus zählt die Aktivierung von Ras und den verschiedenen Signalkaskaden zu den häufigsten, onkogenen Mechanismen und spielt sowohl in der Initiation als auch in der Auf-

rechterhaltung des malignen Phänotyps eine zentrale Rolle {Macdonald, 1993 #143} {Chin, 1999 #37}.

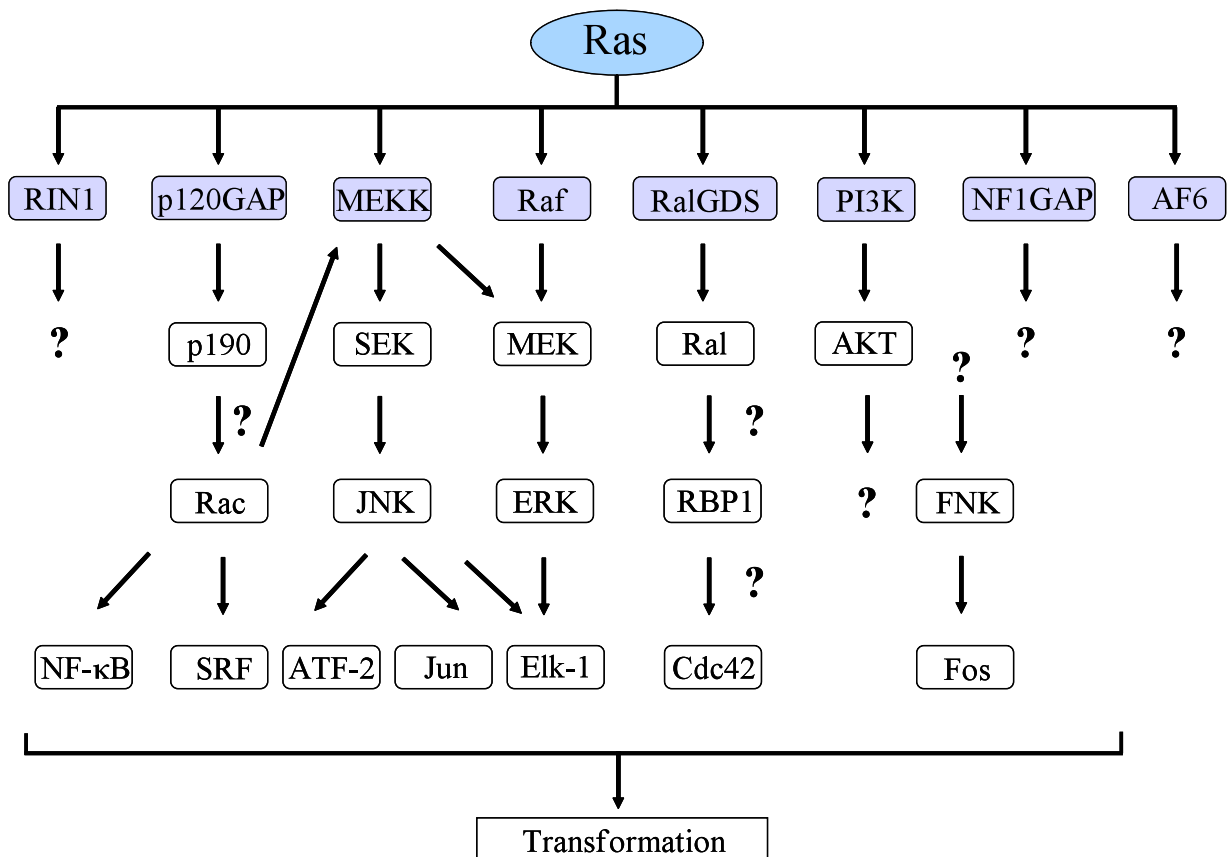


Abbildung 1: Ras interagiert mit einer Vielzahl von Effektoren. Dabei ist noch nicht für alle hier aufgelisteten Signaltransduktionswege geklärt, ob und welche Rolle sie in der Ras-vermittelten Transformation spielen (Abb. aus {Campbell, 1998 #30}).

Bereits 1989 konnte nachgewiesen werden, dass in 30% aller menschlichen Tumore aktivierende Mutationen in einem der Ras-Gene auftreten {Bos, 1989 #19}. Hinsichtlich der Frequenz und der Isoform der mutierten Ras-Gene gibt es zwischen den Tumortypen große Unterschiede {Bos, 1989 #19}. H-Ras liegt in 10% der Blasenkarzinome und Hypernephrome mutiert vor, während Mutationen im N-Ras-Gen verstärkt in Melanomen (13%), hepatozellulären Karzinomen (30%) und in akuter, myeloischer Leukämie vorkommen. Dagegen ist das K-Ras Protein in nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomen (33%), in kolorektalen Karzinomen (44%) und in Pankreaskarzinomen (90%) durch Mutationen bedingt, konstitutiv aktiv {Bos, 1989 #19} {Visvanathan, 1988 #292} {Fujita, 1984 #293}. In klinischen Studien wurde eine erhöhte Ras-Expression wiederholt mit einer schlechten Prognose korreliert, u.a. in Kar-

zinomen des Kolons {Esteller, 2001 #59}, des Pankreas {Castells, 1999 #32} und der Mamma {Clair, 1987 #40}.

Die häufigsten Mutationen in den Ras-Genen führen zu einem Aminosäureaustausch an Position 12, 13, 59 oder 61 {Macaluso, 2002 #142}. Diese Mutationen resultieren in einer verminderten, intrinsischen GTPase-Aktivität von Ras und einer gleichzeitigen Hemmung der Sensitivität gegenüber GTPase-stimulierenden Proteinen. Damit kann das mutierte, aktive Ras-Protein nicht mehr deaktiviert werden und stimuliert unabhängig von externen Stimuli permanent die verschiedenen intrazellulären Kinasekaskaden. Die Aufklärung und detaillierte Analyse der Ras-abhängigen Signalwege zeigte, dass insbesondere die PI3-Kinase und der Raf/Mek-Weg in Tumorzellen große Bedeutung haben {Hunter, 1997 #95}. Ihre Aktivierung kommt in humanen Tumoren nicht nur als Folge eines mutierten Ras Proteins vor, sondern kann ebenso die Folge von Rezeptoramplifikation und Inaktivierung von Tumorsuppressoren sein {Hanahan, 2000 #85} {Simpson, 2001 #226} {Hunter, 1997 #95} {von Lintig, 2000 #259}. Zu den onkogenen Effekten von Ras zählen neben der Zellzyklusstimulation vor allem die Förderung von Invasivität, Metastasierung und Angiogenese und die Aktivierung antiapoptotischer Mechanismen.

Die Transfektion von onkogenem Ras alleine bewirkt sowohl in humanen Zellen als auch in Nagetierzellen Seneszenz {Serrano, 1997 #215}. Diese Seneszenz kann in Nagetierzellen durch die Inaktivierung des p53 Signalweges (Mutationen in p53 oder p19^{ARF}) verhindert und die immortalen Zellen können allein durch die Transfektion eines Ras Onkogens transformiert werden {Stacey, 1984 #235} {Mulcahy, 1985 #166} {Hahn, 2002 #83}. Im Gegensatz dazu benötigen humane Zellen die gleichzeitige Expression der katalytischen Untereinheit der Telomerase (hTERT) und des SV40 Onkoproteins, um die Ras-induzierte Seneszenz zu umgehen {Hahn, 1999 #81} {Hahn, 2002 #82} {Wei, 2003 #269} {Voorhoeve, 2003 #260}. Allerdings weichen einige neuere Arbeiten von dieser Regel ab {Huot, 2002 #96} {Drayton, 2003 #54} {Seeger, 2002 #210}. Die Hemmung des Tumorsuppressors p16(INK4a) beispielsweise verhindert die Ras-induzierte Seneszenz und befähigt die Zellen, verankerungsunabhängig zu wachsen, ohne die zusätzliche Expression der Telomerase oder des SV40 Onkoproteins.

Eine mögliche Ursache für die Unterschiede in der Resistenz gegenüber der Ras-Transformation zwischen humanen Zellen und Nagetierzellen könnte ein Unterschied in der Regulation von Ras-Signalwegen sein {Webb, 1998 #266} {Hamad, 2002 #84}.

1.2 Die Komponenten des Raf-Mek-Erk-Signaltransduktionsweges besitzen unterschiedliche Funktionen in Regulation von Transformation und Proliferation

Das Ras Protein besitzt eine sogenannte Effektordomäne (in H-Ras die Aminosäuren 32-40), die für die Interaktion von Ras mit seinen unterschiedlichen Substraten (Raf, PI3-Kinase, RasGAPs, RalGDS, Mekk1, Rin1 und AF6) essentiell ist {Hunter, 1997 #95} {Van Aelst, 1994 #254}. Definierte Aminosäureaustausche innerhalb dieser Domäne führen zu sogenannten Effektormutanten, die nur noch zur Aktivierung bestimmter Signaltransduktionswege fähig sind {White, 1995 #294}. Humane Zellen können, wenn auch schwach, durch den aktivierten RalGDS-Signaltransduktionsweg transformiert werden, nicht jedoch über einen aktiven Raf-Mek-Erk-Weg. In Mauszellen ist dagegen die Aktivierung der Raf-Mek-Erk-Kaskade für die Transformation der Zellen notwendig {Webb, 1998 #266} {Hamad, 2002 #84}.

Aktives Ras bindet zytoplasmatisches Raf, lokalisiert es an die Innenseite der Zellmembran und führt zu dessen Aktivierung. Raf phosphoryliert Mek, welches seinerseits die Erk Kinase aktiviert (Abbildung 2). Nach der Aktivierung von Erk erfolgt die Translokation in den Zellkern, wo verschiedene nukleäre Proteine phosphoryliert werden, darunter die Transkriptionsfaktoren Ets2, Elk-1, Fra-1, c-Fos, ATF2, c-Myc und Smads (Übersicht in {Yang, 2003 #276}).

Dieses Schema ist allerdings stark vereinfacht dargestellt, da für jede Kinase mehrere Isoformen existieren und es eine Reihe von Quervernetzungen zu anderen Signalkaskaden gibt. Die Familie der Raf Proteine besteht aus drei unterschiedlichen Isoformen: A-Raf, B-Raf und c-Raf-1. Für die Aktivierung werden die Raf-Isoformen von aktivem Ras an die Plasmamembran rekrutiert {Yan, 1998 #275} {Warne, 1993 #263} {Moodie, 1993 #162} {Vojtek, 1993 #256} {Li, 1998 #133}. Dieser Schritt reicht jedoch nicht aus, um die Serin/Threoninkinase Raf vollständig zu aktivieren. Zusätzlich zur Lokalisationsänderung muss eine Dimerisierung der Raf Proteine {Marshall, 1996 #150} {Farrar, 1996 #62} {Luo, 1996 #141} {Weber, 2001 #267} {Farrar, 2000 #63} und die Phosphorylierung verschiedener Domänen stattfinden {Chong, 2001 #39} {Fabian, 1993 #60} {Morrison, 1993 #163} {Mason, 1999 #155}. Dabei konnten für c-Raf-1 bisher 13 Phosphorylierungsstellen mit regulatorischen Funktionen charakterisiert werden {Dhillon, 2002 #51} {Kolch, 2001 #122} {Kolch, 2000 #121} {Abraham, 2000 #3} {Yeung, 1999 #277}. Des Weiteren können bestimmte Adapterproteine wie z.B. Bag1, Hsp70 und 14-3-3 die Aktivität von Raf modulieren {Song, 2001 #231} {Tzivion, 2001 #249}.

Alle Raf Isoformen weisen drei hochkonservierte Domänen, CR1, CR2 und CR3 auf. CR1 ist die Ras-bindende Domäne, während CR2 für die regulatorischen Aktivitäten der Raf-Proteine verantwortlich ist. Die CR3-Domäne beinhaltet die Kinaseaktivität {Daum, 1994 #46} {Avruch, 1994 #13} {Khosravi-Far, 1996 #116} {Marais, 1995 #146}. Trotz dieser strukturellen Gemeinsamkeiten, existieren starke Expressions- und Funktionsunterschiede zwischen den drei Raf-Isoformen. C-Raf-1 ist ubiquitär exprimiert, B-Raf weist eine erhöhte Expression in neuronalem Gewebe und in Testis auf {Barnier, 1995 #16}. A-Raf liegt dagegen primär im Nebenhoden und im Ovar vor {Storm, 1990 #238}. Auch hinsichtlich ihrer Fähigkeit, die Substratkinasen Mek1 und Mek2 zu aktivieren, unterscheiden sich die einzelnen Raf-Isoformen stark. So weist A-Raf nur eine geringe Aktivität gegenüber Mek1/2 auf {Pritchard, 1995 #189}, während die B-Raf Isoform die höchste Bindungsaffinität gegenüber den beiden Substratkinasen besitzt {Catling, 1994 #33} {Jaiswal, 1994 #101} {Reuter, 1995 #194} {Husser, 2001 #97} {Mikula, 2001 #160} {Papin, 1996 #179} {Papin, 1998 #180}.

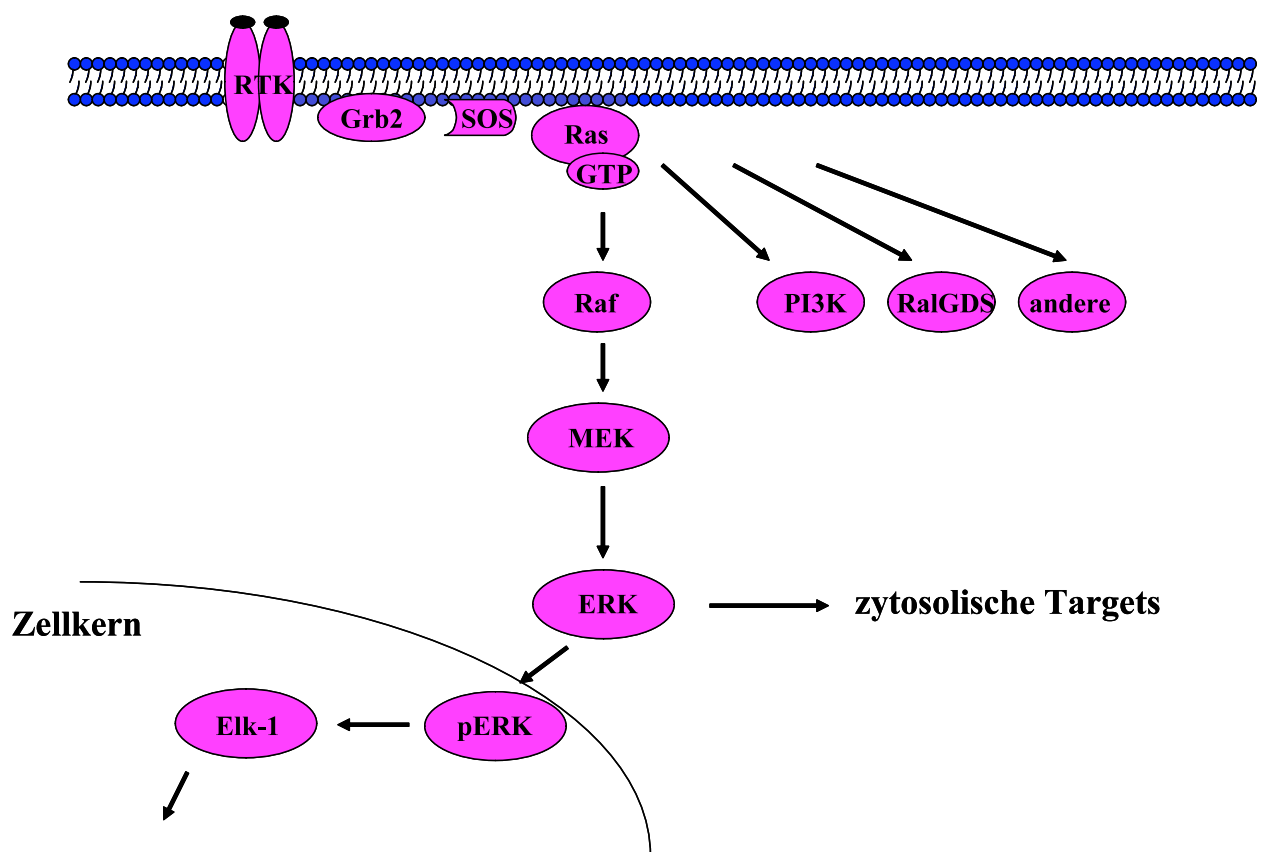


Abbildung 2: Schematische Darstellung des Raf-Mek-Erk-Signaltransduktionsweges. Über eine Reihe von Phosphorylierungsschritten gelangt das Signal von der Zellmembran über das Zytoplasma in den Zellkern.

Experimente mit Zellen aus Raf-Isoform-defizienten Mäusen zeigen, dass sich die Raf-Isoformen nicht gegenseitig in ihren Funktionen kompensieren können. Die Ausschaltung von c-Raf-1 und B-Raf ist bereit im embryonalen Stadium letal {Mikula, 2001 #160} {Huser, 2001 #97} {Wojnowski, 2000 #273}. Dabei weisen die c-Raf-1 defizienten Mäuse einen Defekt in der Plazenta auf {Mikula, 2001 #160} {Huser, 2001 #97}, während die Deletion des B-Raf Gens in vaskulären Abnormalitäten resultiert {Wojnowski, 2000 #273}. Im Gegensatz dazu, versterben A-Raf defiziente Mäuse erst 10-21 Tage nach der Geburt {Pritchard, 1996 #190}, hier liegen Defekte in intestinalen und neuronalen Geweben vor {Pritchard, 1996 #190}. Interessanterweise ist die Aktivierung der beiden Erk Kinasen in keiner der defizienten Mäuse verändert {Mikula, 2001 #160} {Huser, 2001 #97} {Wojnowski, 2000 #273} {Pritchard, 1996 #190}. Bis vor wenigen Jahren konzentrierte sich die Forschung auf die c-Raf-1 Isoform, doch dann erkannten Wissenschaftler, dass in einer Vielzahl von verschiedenen Krebsarten eine mutierte Form der B-Raf Isoform vorliegt, die zu einer verstärkten Erk Aktivierung führt und somit transformierende Eigenschaften besitzt {Davies, 2002 #47} {Hingorani, 2003 #91}. Sehr wenige Daten liegen dagegen für die A-Raf-Isoform vor, weil sie in den meisten Zellen nur in einem geringen Ausmaß exprimiert wird {Pritchard, 1996 #190}.

Die drei Raf-Isoformen phosphorylieren und aktivieren die beiden Mek Isoformen, Mek1 und Mek2 {Wu, 1996 #274}. Andere Mek Isoformen konnten bisher nicht als Substrate der Raf-Isoformen isoliert werden {Kyriakis, 1992 #127} {Dent, 1992 #49} {Force, 1994 #65}. Mek1 und Mek2 ihrerseits phosphorylieren und aktivieren Erk1 und Erk2 {Zheng, 1993 #287} {Robinson, 1996 #198}. Unklar ist, ob zwischen den beiden Mek Isoformen ein Unterschied in ihrer Affinität zu den beiden Substratkinasen Erk1 und Erk2 besteht. Mek1 spielt offenbar eine wichtigere Rolle bei der Weiterleitung des Raf-abhängigen mitogenen Signals {Cowley, 1994 #42} {Coles, 2002 #41} {Marais, 1996 #147}. Im Gegensatz dazu konnten andere Arbeitsgruppen zeigen, dass Mek2 ein wesentlich stärkerer Aktivator von Erk1/2 ist als Mek1 {Khokhlatchev, 1997 #115} {Ussar, 2004 #252}. Überraschenderweise konnte sowohl in Mek1- als auch in Mek2-defizienten Mäusen keine Veränderung der Erk1/2 Aktivität festgestellt werden {Giroux, 1999 #73} {Belanger, 2003 #18}. In Bezug auf die Weiterleitung des mitogenen Signals scheinen sich die beiden Mek Isoformen also gegenseitig zu kompensieren. Ganz anders verhält es sich mit den Auswirkungen der beiden Mek Isoformen auf den Phänotyp der Mäuse. Die Ausschaltung des Mek1 Gens führt zum Tod der Mäuse im Embryonalstadium E10.5 {Giroux, 1999 #73}. Dabei zeigen die Mäuse zum Zeitpunkt ihres To-

des ein vermindertes Wachstum, in manchen Geweben Zeichen von Nekrose und Defekte in der Plazenta {Giroux, 1999 #73}. Im Gegensatz dazu weisen Mek2-defiziente Mäuse keinen ersichtlichen Phänotyp auf {Belanger, 2003 #18}. Die gegenseitige Kompensation der beiden Mek Isoformen ist also nur partiell.

Neben den beiden Erk Isoformen konnten bisher keine weiteren Substrate für Mek1 und Mek2 identifiziert werden. Das mitogene Signal wird ausschließlich über die Aktivierung von Erk1 und Erk2 weitergeleitet. Die beiden Erk Isoformen sind in mehr als 85% ihrer Sequenz identisch, wobei gerade die substratbindenden Domänen hochkonserviert sind {Boulton, 1991 #20} {Boulton, 1991 #21}. Darum konnten bisher auch keine isoformspezifischen Substrate identifiziert werden. Allein die Daten der für Erk1 und Erk2-defizienten Mäuse machen deutlich, dass ein funktioneller Unterschied zwischen den beiden Kinaseisoformen besteht {Pages, 1999 #176} {Saba-El-Leil, 2003 #201}. Erk1-defiziente Mäuse haben einen normalen Phänotyp und sind fruchtbar {Pages, 1999 #176}. Nur bezüglich der terminalen Differenzierung von Thymozyten weisen diese Mäuse einen Defekt auf {Pages, 1999 #176}. Es scheint also, dass die Erk2 Isoform die meisten Funktionen von Erk1 übernehmen kann, dabei ist die Menge an aktivem Erk2 in den defizienten Mäusen nicht erhöht {Pages, 1999 #176}. Andererseits sterben Erk2-defiziente Tiere während der embryonalen Entwicklung am Tag E 6.5 {Saba-El-Leil, 2003 #201}. Die Erk2 Isoform hat vermutlich Funktionen, die von Erk1 nicht übernommen werden können. Zu den Substraten der beiden Erk Kinasen zählen zytoplasmatische Proteine wie die Phospholipase A₂ {Lin, 1993 #137}, die Topoisomerase II-b, das Zinkfingerprotein ZNF7 {Shapiro, 1999 #218} {Fukunaga, 1997 #67} ebenso die Proteinkinasen Rsk 1-3, MAPKAP Kinase-2, Mnk1 und Mnk2 {Waskiewicz, 1997 #264} {Fukunaga, 1997 #67} {Gavin, 1999 #68} {Sturgill, 1988 #239} {Stokoe, 1992 #237} {Zhao, 1996 #286} {Hsiao, 1994 #93}. Da die beiden Erk Isoformen direkt nach der Aktivierung größtenteils in den Zellkern translozieren {Volmat, 2001 #257}, regulieren sie die Expression einer Vielzahl von Genen durch die Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren wie z.B. Mitglieder der AP-1 Familie, der Ets-Domänefaktoren und STAT3 {Janknecht, 1993 #102} {Gille, 1995 #71} {Schuringa, 2000 #208} {Sharrocks, 2000 #219} {Seidel, 2002 #211} {Zhang, 2003 #283}.

1.3 Bedeutung von Ras-Zielgenen für die Ausprägung des transformierten Phänotyps

Wie in Kapitel 1.1 und 1.2 beschrieben, reguliert Ras über die Aktivierung des Raf-Mek-Erk-, des PI3-Kinase- und des RalGDS-Signalweges die Expression einer Vielzahl von Genen z.B. als Antwort auf die Zugabe von Wachstumsfaktoren. Onkogenes Ras führt dagegen unabhängig von extrazellulären Stimuli zu einer ständigen Aktivierung der Signalkaskaden. Damit geht eine Veränderung des Genexpressionsprofils in den jeweiligen Zellen einher {Groudine, 1980 #78} {Augenlicht, 1987 #12} {Aoyama, 1993 #10} {Zuber, 2000 #291} {Tchernitsa, 2004 #244} {Teramoto, 2003 #245}. Zunächst konnten jedoch nur einzelne Ras-Zielgene wie z.B. der Transkriptionsfaktor Jun {Sistonen, 1992 #227}, der Zellzyklusregulator Cyclin D1 {Liu, 1995 #138}, das Signalmolekül Cyclooxygenase-2 {Sheng, 1998 #221}, die Metalloproteinasen MMP-3 und MMP-10 {Sreenath, 1992 #234} {De Vouge, 1992 #50}, der Angiogenesefaktor VEGF {Mazure, 1996 #157}, das Oberflächenmolekül CD44 {Kogerman, 1996 #119}, die Klasse II Tumorsuppressorgene Maspin {Sager, 1997 #202} und H-rev107 {Sers, 1997 #299} und die extrazellulären Proteine Kollagen alpha {Slack, 1992 #228} sowie Mob-1 {Liang, 1994 #136} mittels cDNA-Hybridisierungen oder Westernblot-Analysen identifiziert werden.

Die erste genomweite Analyse von Ras-regulierten Genen erfolgte mittels der subtraktiven Suppressionshybridisierung (SSH) {Diatchenko, 1996 #52} in immortalisierten Rattenfibroblasten (208F) und einem HRAS-transformierten Derivat (FE-8) {Zuber, 2000 #291}. Der umfassende Katalog Onkogen-abhängig, differentiell exprimierter Gene beinhaltet 244 Gene mit bekannter Funktion, 104 exprimierte Sequenzen ohne bekannte Funktion (ESTs) und 45 potentiell neue Gene {Zuber, 2000 #291}. Mittlerweile sind weitere genomweite Analysen von Ras Zielgenen mittels Microarrayanalysen erfolgt {Schulze, 2001 #207} {Heinrich, 2000 #89} {Tchernitsa, 2004 #244}. Wie für das Rattenfibroblastenzellpaar FE-8/208F wurde auch für die spontan immortalisierte Rattenzelllinie Rose199 und ihr KRAS-transformiertes Derivat Rose-A2/5 eine subtraktive cDNA-Bibliothek erstellt {Tchernitsa, 2004 #244}. Unter den differentiell exprimierten Sequenzen befanden sich 192 Gene mit bekannter Funktion, 140 ESTs und 35 potentiell neue Gene {Tchernitsa, 2004 #244}.

In den letzten 30 Jahren hat die Forschung ein komplexes Wissen über die Entstehung von Krebs sammeln können. Die Untersuchungen von humanen Tumoren und Tiermodellen führte zu der Annahme, dass ein Tumor durch die Aufeinanderfolge einer Reihe von genetischen Veränderungen entsteht. Diese Mutationen gehen mit einem Wachstumsvorteil der Zelle einher {Foulds, 1954 #66} {Nowell, 1976 #173}. Douglas Hanahan und Robert Weinberg bau-

ten dieses Modell aus und schlugen vor, dass sich 6 essentielle Veränderungen manifestieren müssen, um eine Zelle maligne werden zu lassen {Hanahan, 2000 #85}. Einer Vielzahl von Genen, die in den beiden subtraktiven Genbanken isoliert werden konnten {Zuber, 2000 #291} {Tchernitsa, 2004 #244}, lassen sich potentielle Funktionen in diesen 6 Schritten zuordnen.

Eine der wichtigsten tumorspezifischen Veränderungen ist die stark herabgesetzte Abhängigkeit von Tumorzellen gegenüber Wachstumsfaktoren. Diese Autonomie kann über drei Mechanismen erreicht werden. Die Zelle kann Wachstumsfaktoren wie z.B. PDGF, TGF α produzieren, die ihre eigene Proliferation fördern. Aber auch Zelloberflächenrezeptoren können durch Überexpression oder strukturelle Veränderungen dereguliert werden. Die dritte Möglichkeit der Zelle, unabhängiger von Wachstumsfaktoren zu werden, sind Veränderungen in den nachgeschalteten Signaltransduktionswegen. Über die Regulation von Transkriptionsfaktoren können diese die Expression einer Vielzahl von Genen beeinflussen. Der Transkriptionsfaktor Fra-1, der zur Fosproteinfamilie gehört, ist in einer Vielzahl von Tumoren stark exprimiert {Risse-Hackl, 1998 #197} {Zajchowski, 2001 #280}. Fra-1 besitzt im Gegensatz zu den anderen Familienmitgliedern keine aktivierende Domäne. Ein hohes Vorkommen von Fra-1 könnte dazu führen, dass sich die Anzahl der aktiven AP-1 Komplexe, die sich aus Fra-1/c-Jun Heterodimeren zusammensetzen, erhöht und es zu einer Abschwächung der Fos-regulierten Genexpression kommt {Kessler, 1999 #114}. Eine erhöhte Expression des Transkriptionsfaktors HMGI-C korreliert mit einem erhöhten Grad an neoplastischer Transformation {Giancotti, 1987 #70} {Vallone, 1997 #253}. Im Gegensatz zu herkömmlichen Transkriptionsfaktoren reguliert HMGI-C die Expression von Genen nicht auf DNA-Sequenzabhängige, sondern auf DNA-Konformationsabhängige Weise {Bustin, 1999 #29} {Bustin, 1996 #28}. HMGI-C selbst weist keine transkriptionelle Aktivität auf, sondern katalysiert den Zusammenbau von Nukleoproteinkomplexen {Falvo, 1995 #61}.

Zwei weitere Eigenschaften, die eine Tumorzelle von einer normalen Zelle unterscheidet, sind die Resistenz gegenüber wachstumshemmenden Signalen und die Möglichkeit, die Apoptose zu umgehen {Hanahan, 2000 #85}. Eine Reihe von p53 interagierenden Genen wie z.B. Gas1, ETF/Tea2 konnten in Ras-transformierten Nagerzellen als differentiell exprimiert gefunden werden {Zuber, 2000 #291} {Tchernitsa, 2004 #244}. ETF/Tea2 beispielsweise induziert die Aktivierung von p53 und führt dadurch zur Induktion von Apoptose und Zellzyklusarrest {Levine, 1993 #132} {Gottlieb, 1996 #75} {Ko, 1996 #118}.

Neben der Vermeidung des Zelltodes durch Apoptose muss die Tumorzelle durch das Umschiffen der Seneszenz unbegrenzt teilungsfähig sein und über den Ausbau von Blutgefäßen

die Versorgung mit ausreichend Sauerstoff und Nährstoffen gewährleisten. Thrombospondin-1, ein wichtiger Inhibitor der Neoangiogenese, ist in Ras-transformierten Nagerzellen supprimiert {Zuber, 2000 #291} {Tchernitsa, 2004 #244}.

Die therapeutisch wichtigste Eigenschaft von Tumoren ist die Fähigkeit zur Invasion und Metastasierung. Eine bedeutende Rolle spielen dabei Proteine, die die Zell-Zell-Interaktionen regulieren wie z.B. die Familie der Cadherine und Integrine. In Ras-transformierten Nagetierzellen konnte neben verschiedenen Cadherinen auch das Protein GADD153 als differentiell exprimiert gefunden werden {Tchernitsa, 2004 #244}. Die Expression von GADD153 wird durch Heregulin- β 1 induziert, welches seinerseits die Proliferation, Differenzierung, Invasion und Migration von Brustkrebszellen beeinflusst {Peles, 1992 #186} {Burden, 1997 #27} {Adam, 1998 #4} {Marte, 1995 #152} {Jones, 1996 #107}.

Die bisher beschriebenen Veränderungen werden direkt oder indirekt durch Mutationen im Genom hervorgerufen. In normalen Zellen führt p53 als Antwort auf DNA-Schäden zum Zellzyklusarrest, um die Reparatur der DNA zu gewährleisten. P53 und mit p53 interagierende Proteine wie z.B. E24, Mdm2 sind in transformierten Zellen differentiell exprimiert {Zuber, 2000 #291} {Tchernitsa, 2004 #244}.

1.4 Hemmung der Genexpression mittels RNA Interferenz

Um Gene funktionell zu analysieren, bieten sich eine Vielzahl von Methoden an. So können die Kandidatengene durch Gentransfer überexprimiert werden oder in Knockout-Studien in vivo ausgeschaltet werden. Diese Methoden sind allerdings sehr zeit- und kostenintensiv. Mittels Transfektion von Antisense-Konstrukten, Ribozymen oder siRNA Duplexen ist eine effiziente und schnelle Untersuchung einer Vielzahl von Genen möglich. Mit der Entdeckung der Funktionalität von siRNA in Säugetierzellen wurde postuliert, dass diese Methode im Vergleich zur Transfektion von Antisensekonstrukten und Ribozymen spezifischer und effizienter ist {Elbashir, 2001 #58}. Erst spätere Daten stellen diese Vorteile der RNA Interferenz wieder etwas in Frage.

RNA Interferenz (Abbildung 3) ist ein natürlich vorkommender Prozess, der in der Abwehr von viraler RNA, der Chromatinmodifikation und in der Regulation von repetitiven Elementen wie Transposons eine Rolle spielt. Das Phänomen wurde in der posttranskriptionellen Inhibition von Genen in Pflanzen entdeckt {Napoli, 1990 #167}, konnte aber in den letzten Jahren auch in einer Vielzahl von eukaryotischen Organismen nachgewiesen werden {Tijsterman, 2002 #247} {Ullu, 2002 #251}.

Durch RNAi werden lange, doppelsträngige RNA Moleküle z.B. viraler Herkunft durch die für doppelsträngige RNA spezifische RNase III Endonuklease Dicer in 21-28 Basenpaar kurze RNA Duplexe (siRNAs) prozessiert. Einige Spezies besitzen mehrere Dicer Gene, die unterschiedliche Substratspezifitäten aufweisen. In *Drosophila melanogaster* konnten 2 verschiedene Gene isoliert werden. Dicer-1 bevorzugt die Vorstufen der miRNAs {Lee, 2004 #129}. miRNAs sind hochkonservierte, nichtkodierende RNAs, die sich in den Genomen von Pflanzen und Tieren finden. Sie stellen eine Klasse von kurzen RNA Duplexen dar, die im Gegensatz zu den siRNAs zu einer Hemmung der Translation führen, indem sie mit der 3'-untranslatierenden Region der mRNA interagieren. Dicer-2 ist dagegen für die Prozessierung langer, doppelsträngiger RNA verantwortlich {Lee, 2004 #129} {Liu, 2003 #139} {Pham, 2004 #187}. In Säugetierzellen wurde bisher nur ein Dicer Gen entdeckt, das offenbar unterschiedliche dsRNA Moleküle erkennen kann. Die siRNA Duplexe besitzen mit einem 5'-Phosphatende und einem 3'-Überhang von 2 Basen eine charakteristische Struktur {Elbashir, 2001 #58}. Das 5'-Phosphatende ist für den Einbau der RNA in den RISC Komplex (*RNA induced silencing complex*) notwendig {Nykanen, 2001 #174} {Schwarz, 2002 #209}. SiRNA Duplexe, die dieses Phosphat nicht besitzen, werden schnell durch endogene Kinasen phosphoryliert und gelangen dann in den RISC Komplex {Schwarz, 2002 #209}.

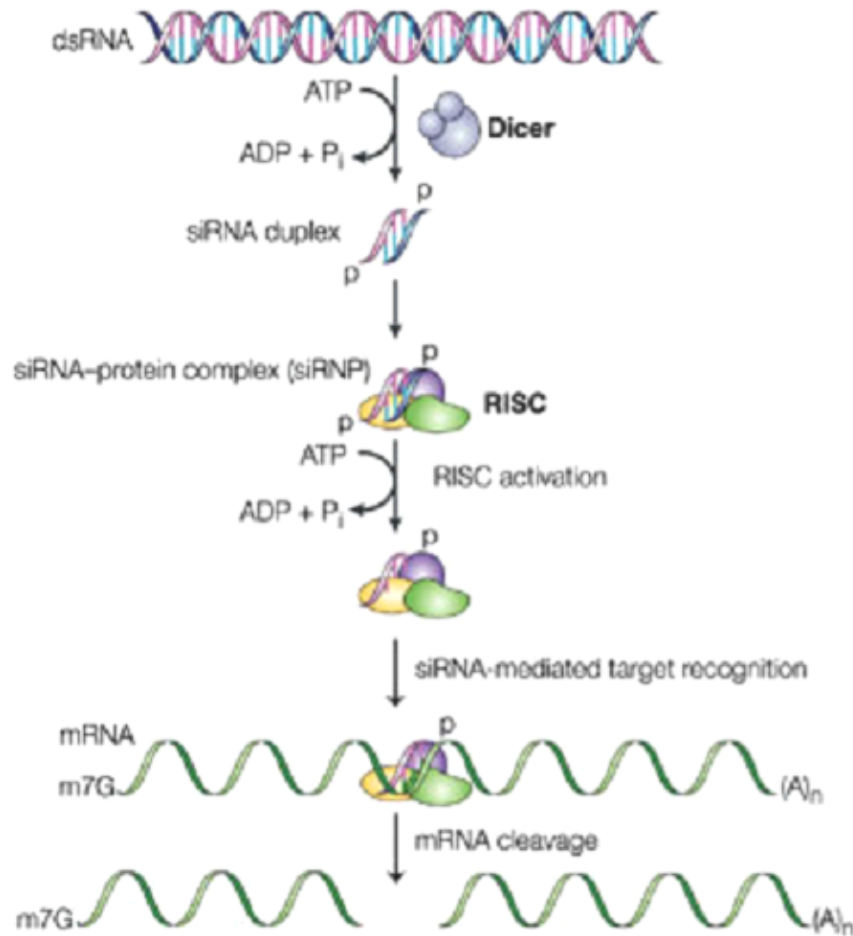


Abbildung 3: Natürlicher Mechanismus der RNA Interferenz. Das Vorkommen von doppelsträngiger RNA in der Zelle z.B. als Folge einer viralen Infektion, löst eine RNA Interferenz Antwort aus. Dabei bindet das zelluläre Enzym Dicer an die dsRNA und schneidet diese in kurze Duplexe (siRNAs). Diese weisen eine Länge von 21-28 Nukleotiden auf und binden an den zellulären Enzymkomplex RISC (RNA induced silencing complex). RISC benutzt nun einen Strang der siRNA um an eine komplementäre, einzelsträngige mRNA zu binden und dann zur Degradierung der mRNA zu führen (Abb. aus {Dykxhoorn, 2003 #56}).

Nach bisherigen Erkenntnissen wird der siRNA Duplex durch die Helikase Armitage und R2D2 entwunden und die einzelsträngige RNA in den RISC Komplex eingebaut {Tomari, 2004 #248} {Liu, 2003 #139}. Dieser Schritt ist ATP abhängig {Pham, 2004 #187} {Nykanen, 2001 #174}. Die einzelsträngige siRNA führt den RISC zu komplementären bzw. fast komplementären Sequenzabschnitten auf der mRNA {Martinez, 2002 #153} {Martinez, 2004

#154}. RISC schneidet die mRNA in der Mitte der komplementären Region, 10 Nukleotide vom 5'-Ende der siRNA {Elbashir, 2001 #58}.

Die Phosphodiesterbindungen zwischen den einzelnen Nukleotiden werden hydrolysiert, so dass 5'-Phosphatenden und 3'-Hydroxylenden entstehen {Martinez, 2004 #154} {Schwarz, 2002 #209}. Die für diese Hydrolyse verantwortliche Nuklease konnte bisher nicht isoliert werden. Zunächst wurde spekuliert, dass Dicer nicht nur für die Hydrolyse der langen, doppelsträngigen RNA Duplexe sondern auch für die Hydrolyse der mRNA zuständig ist. Diese Annahme wurde dadurch bestärkt, dass beide Reaktionsschritte in der Bildung von Produkten mit 5'-Phosphatenden und 3'-Hydroxylenden resultieren und von Magnesiumionen abhängig sind {Provost, 2002 #191} {Zhang, 2002 #282}. Diese These wurde aber aufgrund des geringen Molekulargewichts des RISC verworfen {Martinez, 2002 #153} {Martinez, 2004 #154}. Nun wird vorgeschlagen, dass das Ago-Protein diese Rolle innehat, weil es eine hohe strukturelle Ähnlichkeit zur RNaseH aufweist. Die eigentliche Degradation der mRNA benötigt kein ATP {Nykanen, 2001 #174} {Hutvagner, 2002 #98}, allerdings ist die Durchführung mehrerer „Degradationsrunden“ in der Anwesenheit des Energielieferanten wesentlich effizienter {Hutvagner, 2002 #98}.

Der durch die Transfektion von langer dsRNA induzierte RNA Interferenz Mechanismus wurde zur Untersuchung der Funktion einer Vielzahl von Genen in Pflanzen {Baulcombe, 1999 #17}, Planarien {Sanchez Alvarado, 1999 #204}, Hydras, *Trypanosomes* {Ngo, 1998 #169}, *Drosophila* {Kennerdell, 1998 #113} {Misquitta, 1999 #161}, Moskitos {Caplen, 2002 #31} und Mausoozyten {Svoboda, 2000 #241} {Wianny, 2000 #270} benutzt. Lange dsRNA bietet den Vorteil, dass aus ihr mehrere verschiedene siRNA Duplexe hervorgehen, die sehr effizient zur Degradation der jeweiligen Ziel-mRNA führen. Bei Säugetierzellen ist dagegen die Verwendung von langer dsRNA (>30 Basenpaaren) nicht möglich, weil diese eine unspezifische Interferonantwort induziert {Elbashir, 2001 #58}. Interferon kann durch die Aktivierung der 2'-5'-Oligoadenylatsynthase und der darauf folgenden Rekrutierung der RNase L zu einer unspezifischen Degradation der mRNA führen. Außerdem kann Interferon die Proteinkinase R (PKR) aktivieren, die seinerseits zu einer Phosphorylierung des Translationsinitiationsfaktors eIF2 α und somit zu einer globalen Inhibition der Translation führt {Stark, 1998 #236}. Erst durch die Transfektion von kurzen, chemisch synthetisierten siRNAs (<30 Basenpaaren) konnte diese unspezifische Interferonantwort umgangen werden {Elbashir, 2001 #58}. Somit stand der Forschung eine Methode zur Verfügung, die im Vergleich zur homologen Rekombination oder antisense Technologie wesentlich schneller und somit günstiger, aber auch effizienter und spezifischer zu sein schien. Doch mit steigender Anzahl der mit

RNA Interferenz erhaltenen Daten stellten sich auch Nachteile der Methode ein. Wider Erwarten kann auch die Transfektion von kurzen RNA Duplexen zu einer Interferon Antwort führen {Sledz, 2003 #229}. Auch die Spezifität der siRNA scheint nicht in dem zunächst angenommenen Ausmaß gewährleistet zu sein {Jackson, 2003 #100}. Bei entsprechender Planung von RNAi Design und experimentellen Kontrollen stellt die RNA Interferenz jedoch nach wie vor eine hoch effiziente und spezifische Methode dar.

1.5 Ziel der Arbeit

In vielen humanen Neoplasien findet sich eine erhöhte Aktivität des Raf-Mek-Erk-Signaltransduktionsweges. Der Einsatz neuartiger Inhibitoren von Raf und Mek zeigte die Bedeutung dieser Signalkaskade für die ungebremste Proliferation von Tumorzellen.

Während die Verwendung von Enzyminhibitoren die Ausschaltung aller drei Raf bzw. der beiden Mek Kinasen bewirkt, sollte in dieser Arbeit jede einzelne Isoform mittels spezifischer siRNA Duplexe inhibiert werden. Dabei sollten isoformspezifische Unterschiede zwischen den drei Raf Isoformen A-Raf, B-Raf, c-Raf, den beiden MEK Isoformen, Mek1 und Mek2 sowie den beiden ERK Kinasen Erk1 und Erk2 in der Kontrolle von Proliferation, zellulärer Morphologie und Transkriptionsregulation untersucht werden. Weiterhin sollten durch die siRNA vermittelte Inhibition potentielle neue Rückkopplungsprozesse identifiziert werden und somit ein tieferer Einblick in die Vernetzung der Raf-Mek-Erk-Kaskade mit anderen Signaltransduktionswegen gewonnen werden

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden von Calbiochem (Kalifornien, USA), J.T Baker (Deventer, Niederlande), Merck (Darmstadt, Deutschland), R&D Systems Inc. (Minnesota, USA), Serva Electrophoresis GmbH (Heidelberg, Deutschland), Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München, Deutschland) und Sigma (MS, USA) bezogen.

Wenn nötig wurde mit 18Ω Wasser gearbeitet.

2.1.2 Chemisch synthetisierte siRNAs

Die aufgelisteten Sequenzen wurden als einzelsträngige RNA (s=sense, a=antisense) durch die Firma Dharmacon (Dharmacon, Lafayette, Co) synthetisiert, aufgereinigt und lyophilisiert.

Genname	Sequenz 5'-3'	Lokalisation in der Zielsequenz	CG-Gehalt	Spezies
HRAS- V12 s	GCCGUCGGUGUGGGCAAGAdTdT	163-181	68%	Mensch
HRAS- V12 a	UCUUGCCCACACCGACGGCdTdT	163-181	68%	Mensch
HRAS- WT s	GCCGGCGGUGUGGGCAAGAdTdT	163-181	74%	Mensch
HRAS- WT as	UCUUGCCCACACCGCCGGCdTdT	163-181	74%	Mensch
HRAS- V12 2ms s	GCCGGCGGUGUGGGGAAGAdTdT	163-181	74%	Mensch
HRAS- V12 2ms a	UCUUCCCCACACCGCCGGCdTdT	163-181	74%	Mensch
HRAS-V12 2m s	GCCGGGGGUGUGGGCAAGAdTdT	163-181	74%	Mensch
HRAS-V12 2m a	UCUUGCCCACACCCCGGCdTdT	163-181	74%	Mensch
KRAS- V12 s	GUUGGAGCUGUUGGCGUAGdTdT	38-56	58%	Mensch
KRAS- V12 a	CUACGCCAACAGCUCCAACdTdT	38-56	58%	Mensch
EGFP s	AAGACCCGCGCCGAGGUGAAGdTdT	934-954	67%	
EGFP a	AACUUCACCUCGGCGCGGGUCdTdT	934-954	67%	
A-Raf s	AACAGCGGGAGCGGAAGUCCUdTdT	917-938	59%	Maus

A-Raf a	AAGGACUUCGGCUCCCGCUGUdTdT	917-938	59%	Maus
c-Raf-1 s	GCUGUCUACUCGGAUCGGGUCAdTdT	1246-1267	59%	Maus
c-Raf-1 a	UGACCCGAUCCGAGUAGACAGCdTdT	1246-1267	59%	Maus
Mek1 s	GCAGCUCAUGGUACAUGC UUUCdTdT	1151-1172	50%	Maus
Mek1 a	GAAAGCAUGUACCAUGAGCUGCdTdT	1151-1172	50%	Maus
Mek2 s	CUGCUGGACUACAUAGUGAACGdTdT	1143-1164	50%	Maus
Mek2 a	CGUUCACUAUGUAGUCCAGCAGdTdT	1143-1164	50%	Maus
Erk1 s	AGCGGCUGAAGGAGUUGAUCUdTdT	1090-1111	50%	Maus
Erk1 a	AAGAUCAACUCCUUCAGCCGCUdTdT	1090-1111	50%	Maus
Erk2 s	GGAGAAGCUCAAAGAACUCAUdTdT	1202-1223	41%	Maus
Erk2 a	AAUGAGUUCUUUGAGCUUCUCCdTdT	1202-1223	41%	Maus
Fra-1 s	CUACCCGUUGUCAUCUCCUUCdTdT	1081-1102	50%	Maus
Fra-1 a	GAAAGGAGAUGACAACGGGUAGdTdT	1081-1102	50%	Maus

Zusätzlich wurden noch einige siRNA Duplexe über die Firma Eurogentec (Eurogentec, Herstal, Belgien) bezogen.

Genname	Sequenz 5'-3'	Lokalisation in der Zielsequenz	CG-Gehalt	Spezies
NAB1-1s	GCCCAUCCACAGUAAUGGCdTdT	593-611	61%	Ratte
NAB1-1a	GCCAUUACUGUGGAUGGGCdTdT	593-611	61%	Ratte
p105 s	GCUGAUUGGGAAGGAAGUCdTdT	215-233	53%	Ratte
p105 a	GACUCCUUCCAAUCAGCdTdT	215-233	53%	Ratte
NF-1 s	GAAGCACGAGAAGCGCAUGdTdT	137-155	58%	Ratte
NF-1 a	CAUGCGCUUCUCGUGCUUCdTdT	137-155	58%	Ratte
P160 s	GCCCUGAUGAAGUGCGUGAdTdT	256-274	58%	Ratte
P160 a	UCACGCACUUCAUCAGGGCdTdT	256-274	58%	Ratte
EI24 s	GAGAGAAGAGCAGCGUCGAdTdT	245-263	58%	Ratte

EI24 a	UCGACGCUGCUCUUCUCUCdTdT	245-263	58%	Ratte
GADD153 s	GCCUGGUAUGAGGAUCUGCdTdT	146-164	58%	Ratte
GADD153 a	GCAGAUCUCAUACCAGGCdTdT	146-164	58%	Ratte
BARD1 s	GUUGUUGCGCUGCUCGCCGdTdT	136-154	68%	Ratte
BARD1 a	GCGGGAGCAGCGCAACAACdTdT	136-154	68%	Ratte
HMGI-C I s	GCAAGGGCGUGUGGUUGAAAdTdT	369-387	58%	Ratte
HMGI-C I a	UUCAACCACACGCCCUGCdTdT	369-387	58%	Ratte
HMGI-C II s	AACUCCCGAGCCGUAGCGGdTdT	1-19	68%	Ratte
HMGI-C II a	CCGCUACGGCUCGGGAGUdTdT	1-19	68%	Ratte
ETF I s	AGUGAACGCGGAGCCCAGCdTdT	1182-1200	68%	Ratte
ETF I a	GCUGGGCUCCGCGUUCACUdTdT	1182-1200	68%	Ratte
ETF II s	GACCAGAACUCGAAAGCAGdTdT	227-245	53%	Ratte
ETF II a	CUGCUUUCGAGUUCUGGUCdTdT	227-245	53%	Ratte

2.1.3 DNA-Oligonukleotide zur Herstellung von siRNA-Duplexen mittels reverser Transkription

Die chemische Synthese von siRNA Duplexen ist eine kostspielige Angelegenheit. Um die Herstellung der siRNA Duplexe kostengünstiger zu gestalten, wurde das *Silencer*TM siRNA Construction Kit der Firma Ambion verwendet. Dabei wurden die unten aufgelisteten DNA-Oligonukleotide (vw=vorwärts; rw=rückwärts) mittels T7 reverser Transkription in siRNA Duplexe umgeschrieben.

Genname	Sequenz 5'-3'	Lokalisation in der Zielsequenz	CG-Gehalt	Spezies
Mek1neu vw	AACTTGAAGACCACTCCACCGCCTGTCTC	324-344	52%	Maus
Mek1neu rw	AACGGTGGAGTGGTCTTCAAGCCTGTCTC	324-344	52%	Maus
Mek2neu vw	AAGATGTCTTCAGGAATCCGCCCTGTCTC	610-628	48%	Maus
Mek2neu rw	AAGCGGATTCCTGAAGACATCCCTGTCTC	610-628	48%	Maus
Erk1neu vw	AATTCCTCTACTGTGATGCGCCCTGTCTC	943-963	48%	Maus

Erk1neu rw	AAGCGCATCACAGTAGAGGAACCTGTCTC	943-963	48%	Maus
Erk2neu vw	AATGTCAAACCTTGAATGGCGCCCTGTCTC	1031-1051	43%	Maus
Erk2neu rw	AAGCGCCATTCAAGTTTGACACCTGTCTC	1031-1051	43%	Maus
A-Raf I vw	AAGGCCAGGCTGAAGAATGTCCCTGTCTC	403-423	52%	Maus
A-Raf I rw	AAGACATTCTTCAGCCTGGCCCCTGTCTC	403-423	52%	Maus
A-Raf II vw	AACGACTGGAAGCTGTAGGGGCCTGTCTC	1537-1557	57%	Maus
A-Raf II rw	AACCCCTACAGCTTCCAGTCGCCTGTCTC	1537-1557	57%	Maus
B-Raf vw	AACGTGTCCCAGCCAATTGGTCCTGTCTC	787-807	52%	Maus
B-Raf rw	AAACCAATTGGCTGGGACACGCCTGTCTC	787-807	52%	Maus
B-Raf 8b vw	AAGTAATTCCACTTCTGGGAACCTGTCTC	8-28	38%	Maus
B-Raf 8b rw	AATTCCCAGAAGTGGAATTACCCTGTCTC	8-28	38%	Maus
B-Raf 10 vw	AAAAGACAGCGCATCAGTTGGCCTGTCTC	15-33	48%	Maus
B-Raf 10 rw	AACCAACTGATGCGCTGTCTTCCTGTCTC	15-33	48%	Maus
Odc I vw	AAGTACTGATCCTGATACCTTCCTGTCTC	1342-1360	38%	Maus
Odc I rw	AAAAGGTATCAGGATCAGTACCCTGTCTC	1342-1360	38%	Maus
Odc II vw	AAATCCTGATACCTTCGTTACCTGTCTC	1348-1366	38%	Maus
Odc II rw	AATGAACGAAGGTATCAGGATCCTGTCTC	1348-1366	38%	Maus
Ccnd I vw	AATCTACACTGACAACTCTATCCTGTCTC	514-532	33%	Maus
Ccnd I rw	AAATAGAGTTGTCAGTGTAGACCTGTCTC	514-532	33%	Maus
Ccnd II vw	AAGATGTGAAGTTCATTTCCACCTGTCTC	711-729	33%	Maus
Ccnd II rw	AATGGAAATGAACTTCACATCCCTGTCTC	711-729	33%	Maus

2.1.4 siRNA Duplexe (synthetisiert von Dr. Matthias Truss im Labor für funktionelle Genomanalyse der Charite)

Genname	Targetsequenz 5'-3'	Lokalisation in der Zielsequenz	CG-Gehalt	Spezies
BARD1	AAGAGGCTCCTGAGAAGAAGG	888-908	58%	Ratte
P160	AAGCTGTGGTCGAGCAAATAG	1199-1219	53%	Ratte

NF-1	AAGGAGCTGGACCTGTACCTG	528-548	63%	Ratte
p105	AAGGAAGGTTTTGCCCGCTGT	810-830	58%	Ratte
EI24	AAGTTGTGAGTCTCTTCCCCA	702-723	53%	Ratte
GADD153	AAGGAGAAGGAGCAGGAGAAT	446-466	53%	Ratte
HMGI-C	AAGCCCACAAGCTCTCTTTCC	1247-1267	58%	Ratte
NAB1	AAGGACAATGCCCTGCTGACG	1459-1479	63%	Ratte

2.1.5 Primer für die RT-PCR

Genname	Sequence 5'-3'	Anlagerungstemperatur
A-Raf 5'	ACCATGCACAATTTTGTACGG	55,9°C
A-Raf 3'	ACTTTTTTCTTTTCATCTGCC	52°C
B-Raf 5'	ACAACACACAACCTTTGTACGG	55,9°C
B-Raf 3'	GTTTATATGAACATTGGGAGC	54°C
c-Raf-1 5'	GTTTCCAAATTCCACTGTTGG	55,9°C
c-Raf-1 3'	TTTTGTTTTTTTCCTGGGTCC	54°C
Mek1 5'	TAGCATTGCTGTGATAAAAGG	54°C
Mek1 3'	ATCCAACAACCTCAAAAATTGC	52°C
Mek2 5'	TCATGCACAGAGATGTGAAGC	57,9°C
Mek2 3'	TCGTTCACTATGATGTCCAGC	57,9°C
B-Raf O5	TCGACCAATTCCACAGCC	58°C
B-Raf O10	ATCCGACTTCTGTCCTCC	56°C
B-Raf O17	AATCAAACACTATTTCACTGG	56°C
B-Raf O7	CGAAAAATTCCCAGAAGTGG	58°C
EI24 5'	GACTGACAGTGTCAAACC	56°C
EI24 3'	GCCATGTCCAAACATCTCC	58°C

GADD153 5'	CTTTGAGACAGTGTCCAGC	58°C
GADD153 3'	TCTCTTCAGCAAGCTGTGC	58°C
HMGI-C 5'	GGGACACAGTTTAACAATGC	58°C
HMGI-C 3'	GTGTCTACAAGATTATACGC	56°C
ETF 5'	CCTGACATCGAGCAGAGTTT	60°C
ETF 3'	AGTTCTGGTCAGGGAGCTCT	62°C
NAB1 5'	GAAAGCATTTTAAACGCACG	56°C
NAB1 3'	AACCCAATCTCTCAAAGCC	56°C
BARD1 5'	ATGGAACCAGCTACCGACG	60°C
BARD1 3'	CTTACTTCGAGGACTAAACC	58°C
P160 5'	ATCTACAAGCAATGAACAAGG	58°C
P160 3'	CTTCTGAGAACAGATCAACC	58°C
NF-1 5'	CCTGGTTCAACCTGCAGG	58°C
NF-1 3'	GACGCCACACTTTGTCTGG	58°C
p105 5'	CTGCTAGAGAGTTCCTTCG	58°C
p105 3'	CAATGATAGCATTGACAGGC	58°C

2.1.6 Kits

Name	Hersteller
Titan one Tube RT-PCR Kit	Roche, Mannheim, Deutschland
RNase-free DNase Set	Qiagen, Hilden, Deutschland
Trizol Reagent	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
<i>Silencer</i> TM siRNA Construction Kit	Ambion, Cambridgehire, England
Cell proliferation Kit XTT	Roche, Mannheim, Deutschland
ECL Western blotting detection reagents	Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland
Western Blot recycling Kit	Alpha Diagnostic International, TX, USA

Developer RP X-OMAT EX	Eastman Kodak Company, NY, USA
Fixer RP X-OMAT LO	Eastman Kodak Company, NY, USA
Protease Inhibitors Cocktail	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany
Array 50 Expression Array Detection Kit	Genisphere Inc., PA, USA

2.1.7 Antikörper

Antikörper	Hersteller
anti-Ras	Transduction Laboratories, Lexington, KY
anti-Raf-1	Santa Cruz Biotechnology, Inc., CA, USA
anti-Mek1	Cell Signaling Technology, Inc., MA, USA
anti-Mek2	Cell Signaling Technology, Inc., MA, USA
anti-phospho-Mek1/2	Cell Signaling Technology, Inc., MA, USA
anti-p42/p44-Mapk	Cell Signaling Technology, Inc., MA, USA
anti- Erk1	Transduction Laboratories, Lexington, KY
anti-phospho-Elk (Ser383)	Cell Signaling Technology, Inc., MA, USA
anti-phospho-p65-NFκB (Ser536)	Cell Signaling Technology, Inc., MA, USA
anti-p70 S6 kinase (Thr421/Ser424)	Cell Signaling Technology, Inc., MA, USA
anti-Creb-1	Santa Cruz Biotechnology, CA, USA
anti-Cyclin D1	Santa Cruz Biotechnology, Inc., CA, USA
anti-phospho-PKC epsilon	Upstate Ltd, UK
anti-phospho-PKC delta (Thr643)	Cell Signaling Technology, Inc., MA, USA
anti-phospho-PKC alpha	Cell Signaling Technology, Inc., MA, USA
anti-phospho-PKC pan	Cell Signaling Technology, Inc., MA, USA
anti-phospho-Bad (Ser136)	Cell Signaling Technology, Inc, MA, USA
anti-Bcl-xl	Cell Signaling Technology, Inc., MA, USA
anti-cleaved-caspase 9	Cell Signaling Technology, Inc., MA, USA
anti-caspase 3	Cell Signaling Technology, Inc, MA, USA
anti-cleaved-caspase 3	Cell Signaling Technology, Inc., MA, USA
anti-cleaved-caspase 7	Cell Signaling Technology, Inc., MA, USA
anti-Parp	Transduction Laboratories, Lexington, KY
anti-Ral A	Transduction Laboratories, Lexington, USA
anti-Fra-1 R20	Santa Cruz Biotechnology, Inc., CA, USA
anti-Odc (N15)	Santa Cruz Biotechnology, Inc., CA, USA

anti-phospho-PKR (Thr446/451)	Cell Signaling Technology, Inc., MA, USA
anti-STAT1	Cell Signaling Technology, Inc., MA, USA
anti-phospho-STAT1 (Tyr701)	Cell Signaling Technology, Inc., MA, USA
anti-phospho-eIF2 α	Cell Signaling Technology, Inc., MA, USA
anti-Histone H3	Cell Signaling Technology, Inc., MA, USA
anti-pan-actin	Chemicon, CA, USA

2.1.8 Zelllinien

Name	Beschreibung
NIH3T3	Mausfibroblasten, American Type Culture Collection
NIH3T3	Mausfibroblasten, American Type Culture Collection
Fe-8	HRAS-transformiertes Derivat der immortalisierten, nicht tumorigenen Rattenfibroblasten-Zelllinie 208F (Griegel et al., 1986)
EJ	humane Blasencarcinomzelllinie, die endogenes mutiertes HRAS besitzt (Parada et al., 1982)
208F	immortalisierte, nicht tumorigene Rattenfibroblasten Zelllinie (Griegel et al., 1986)
Rose A2-5	KRAS-transformiertes Derivat der epithelialen Rattenovarzelllinie Rose 199 (Tchernitsa et al., 2004)
Rose 199	Epitheliale Rattenovarzelllinie (Adams und Auersperg, 1985)

2.2 Methoden

2.2.1 siRNA Herstellung

2.2.1.1 siRNA Design

Zu Beginn der Arbeit wurden aus Mangel an vorhandenen Such-Algorithmen, die Zielsequenzen der siRNA-Duplexe per Hand ausgewählt. Dabei wurde darauf geachtet, dass der CG-Gehalt der Duplexe zwischen 40-60% lag und die Sequenz mit zwei Adeninen begann. Im Laufe der Arbeit sind verschiedene Programme entwickelt worden, die eine mehr oder weniger gute Selektion von Duplexsequenzen ermöglichen. Die in dieser Arbeit benutzten Internetseiten sind:

www.ambion.com

<http://jura.wi.mit.edu/bioc/siRNA/home.php>

<http://sfold.wadsworth.org/sirna.pl>

Das erste siRNA-Design-Programm wurde von der Firma Ambion entwickelt. Allerdings unterliegt hier die Suche der potentiellen siRNAs keinen beschränkenden Kriterien, wie z.B. dem CG-Gehalt. Die Software sucht die eingegebene mRNA nach allen 21 Basenpaar langen Sequenzen ab, die mit zwei Adeninen beginnen. Die eigentliche Auswahl der verwendeten siRNA Duplexe erfolgte auch hier wieder per Hand.

Mit der Zeit wurden immer mehr systematische Untersuchungen mit siRNA Duplexen durchgeführt, die verschiedene Selektionsparameter für die Suche nach effizienten siRNA Zielsequenzen postulierten. Diese neuen Erkenntnisse wurden auch in die Entwicklung neuer Such-Algorithmen einbezogen. Das Programm des Whitehead Instituts wählt dabei nur solche siRNA Duplexe aus, die einen CG-Gehalt zwischen 30-70% aufweisen und keine 4 aufeinanderfolgenden Adenine, Cytosine, Guanine oder Thyminide besitzen. Noch selektiver ist der Such-Algorithmus des Wadsworth Center, der zusätzlich zu den beiden oben beschriebenen Kriterien noch die Zugänglichkeit und Sekundärstruktur der Ziel-mRNA einbezieht.

Die Programme gewähren also eine immer selektivere Suche nach effizienten siRNA Duplexen.

2.2.1.2 Herstellung von siRNA-Duplexen aus chemisch, synthetisierten, einzelsträngigen RNAs

Die einzelsträngig gelieferten RNAs der Firmen Dharmacon und Eurogentec wurden nach den Protokollen der Hersteller behandelt.

Die von der Firma Dharmacon bezogenen kurzen, einzelsträngigen RNAs wurden durch die Zugabe von RNase-freiem Wasser auf eine Konzentration von 400µM eingestellt. Für die Annealingreaktion wurden je 5µl der sense und der antisense RNA mit 10µl 10x RNAi-Puffer (100mM Kaliumacetate; 30mM Hepes-Kaliumhydroxid pH 7,4; 2mM Magnesiumacetate) gemischt und mit Wasser auf ein Gesamtvolumen von 100µl gebracht. Der Reaktionsansatz wurde durch Pipettieren gemischt, zuerst für 1 Minute bei 90 °C und danach für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Die siRNA-Duplexe wurden bei -20°C gelagert.

Die einzelsträngigen RNA Moleküle der Firma Eurogentec wurden mit RNase-freiem Wasser auf eine Konzentration von 100µM gebracht. Davon wurden 30µl der sense Probe mit 30µl

der antisense Probe vermischt und 15µl 5x Annealing Puffer hinzugefügt. Der Ansatz wurde dann für 2 Minuten bei 92°C erhitzt und danach langsam auf Raumtemperatur abgekühlt. Die siRNA Duplexe wurden bei –20°C gelagert.

Alle chemisch synthetisierten siRNA Duplexe wurden bei der Transfektion in einer Endkonzentration von 100nM eingesetzt.

2.2.1.3 Herstellung von siRNA-Duplexen mittels T7 reverser Transkription

Um die Kosten für die Herstellung der siRNA Duplexe möglichst gering zu halten, wurden im Laufe der Arbeit die benötigten siRNA-Duplexe mittels T7 reverser Transkription hergestellt. Dazu wurde das *Silencer*TM siRNA construction Kit der Firma Ambion benutzt. Die Synthese erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers und die verwendeten DNA-Oligonucleotide wurden über die Firma MWG Biotechnologie bezogen. Die Qualitätskontrolle der siRNA Duplexe erfolgte auf einem 2%igen Agarosegel. Alle auf diese Weise hergestellten siRNA-Duplexe wurden für die Transfektion in einer Endkonzentration von 1- 5nM eingesetzt.

2.2.2 Zellkultur- allgemeine Techniken

2.2.2.1 Kultivierung von Säugetierzelllinien

Die Zellen wurden in Dulbecco's modified Eagles Medium (DMEM) versetzt mit 10% fötalem Kälberserum, 2mM Glutamine, 100 Einheiten/ml Penicillin und 100 Einheiten/ml Streptomycin (D10 Medium) gehalten. Dem Medium für die Rattenzelllinie Rose A2-5 wurde zusätzlich noch G418 (400µg/µl) zugefügt.

Um die Zellen zu passagieren, wurde das Medium aus den Kulturflaschen entnommen und die Zellen mit 1x PBS gewaschen. Auch das 1x PBS wurde aus den Kulturflaschen abgesaugt. Es wurde so lange mit 3-5ml Trypsin-EDTA (0,5% Trypsin und 0,2% EDTA von Biochrom AG) bei 37°C inkubiert, bis das Ablösen der Zellen unter dem Mikroskop beobachtet werden konnte. Nach Zugabe von 5ml frischem D10 Medium wurden die Zellen 10 Minuten bei 700rpm zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 3ml frischem D10 Medium resuspendiert und im Falle einer Passage wurde die gewünschte Menge in frische Gewebekulturflaschen mit vorgelegtem Medium überführt. Die Zellen wurden im Inkubator bei 5%iger CO₂-Atmosphäre bei 37°C und 95% Luftfeuchtigkeit gehalten.

10x PBS Lösung (pH 7.2)

2,3 g/l NaH₂PO₄

11,5 g/l Na₂HPO₄

2.2.2.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Eingefrorene Zellen wurden für 1-2 Minuten in einem 37°C- Wasserbad aufgetaut und sofort in ein 15ml Röhrchen überführt. Tropfenweise wurden dann 10ml D10 Medium langsam zu den Zellen gegeben und das 15ml Röhrchen dabei leicht geschüttelt. Nach einer Zentrifugation bei 700 rpm wurde das Zellpellet in 10ml frischem D10 Medium resuspendiert und in eine 75cm² Zellkulturflasche transferiert.

Wenn die Zellen in der Zellkulturflasche eine Konfluenz von mindestens 70% aufwiesen, wurde das Medium entnommen und die Zellen mit 1x PBS gewaschen. Nach Zugabe von Trypsin-EDTA und einer Inkubation bei 37°C wurden die abgelösten Zellen in ein 15ml Röhrchen überführt und bei 700rpm für 10 Minuten zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 900µl D10 Medium aufgenommen und 100µl DMSO hinzugegeben. Die Lösung wurde in ein Cryoröhrchen überführt, das dann über Nacht in einem mit Isopropanol gefüllten Behälter im -80°C Schrank gelagert wurde. Das Isopropanol gewährleistet dabei eine stufenweise Abkühlung der Zellen auf -80°C. Nach 24 Stunden wurden die Cryoröhrchen in einen Stickstofftank überführt.

2.2.2.3 Bestimmung der Zellzahl

Die Anzahl der Zellen wurde mittels einer Zählkammer nach Neubauer bestimmt. Vor der Verwendung der Zählkammer wurde darauf geachtet, dass an den Kontaktstellen zwischen dem Spezialdeckglas und der Neubauer-Zählkammer Newtonsche Ringe zu erkennen waren. Die Zellsuspension (trypsinisierte Zellen in D10 Medium) wurde gut durchmischt, bevor mit einer Pasteurpipette soviel Zellsuspension entnommen wurde, um einen Tropfen am Rand der Zählkammer zu bilden. Der Tropfen wurde durch die Kapillarkraft in die Zählkammer gesogen. Es wurden 4 große Quadrate ausgezählt, der Mittelwert bestimmt und schließlich mit 10⁴ multipliziert, um die Zellzahl pro ml Zellsuspension zu erhalten.

2.2.2.4 Transfektion von siRNA Duplexen-Lipofektion

Alle Transfektionen wurden in 6well-Platten durchgeführt und erfolgten mit Hilfe des Transfektionsreagenz Oligofectamine (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland). 4x10⁴ Zellen wurden 24 Stunden vor der Transfektion in D10 Medium ausplattiert. Vor der Transfektion wurde das

Medium von den Zellen abgesaugt, die Zellen einmal mit 1x PBS gewaschen und 800µl OPTI-MEM I Medium (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) zugegeben.

Der Transfektionsansatz wurde in 1,5ml Reaktionsgefäßen angesetzt. Hierzu wurden 175µl OPTI-MEM I mit 10µl siRNA Duplexen durch Pipettieren gemischt (Reaktionsansatz I). In einem zweiten 1,5ml Reaktionsgefäß wurden 12µl OPTI-MEM mit 3µl Oligofectamine versetzt (Reaktionsansatz II). Beide Ansätze wurden für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von Reaktionsansatz II zu Reaktionsansatz I wurde die Lösung für 25 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und dann zu den Zellen gegeben. Die Zellen wurden anschließend für 4 Stunden bei 37°C inkubiert. Die Transfektion wurde durch Zugabe von 500µl OPTI-MEM I versetzt mit 30%igem fötalem Kälberserum gestoppt. Eine zweite Transfektion erfolgte zu einem 24 Stunden späteren Zeitpunkt.

2.2.2.5 Herstellung mit PolyHema beschichteter 96well Platten

Poly-2-hydroxyethyl Methacrylate (PolyHema) ist ein Polymer, das die Verankerung von Zellen auf Oberflächen verhindert. Platten, die mit diesem Polymer beschichtet sind, erlauben also nur solchen Zellen zu wachsen, die zu verankerungsunabhängigem Wachstum fähig sind. Zunächst wurden 5mg /ml PolyHema in 95% Ethanol bei 37°C unter Rühren gelöst. Pro Vertiefung einer 96well-Platte wurden dann 75µl des Gemischs pipettiert und die Platten zum Trocknen für mindestens 3 Tage in einen 37°C-Inkubatorschrank gestellt. Die gleichmäßige Beschichtung wurde unter dem Mikroskop kontrolliert.

2.2.2.6 Bestimmung des zwei- und dreidimensionalen Wachstums mittels XTT-Assays

Um den Einfluss der siRNA-vermittelten Inhibition bestimmter Gene auf das Wachstum von Säugetierzellen zu untersuchen, wurde der Cell Proliferation Kit XTT der Firma Roche verwendet.

24 Stunden nach der zweiten Transfektion mit siRNA Duplexen wurden 5×10^2 Zellen (2-dimensionales Wachstum) bzw. 2×10^3 Zellen (3-dimensionales Wachstum auf PolyHema-beschichteten 96 well Platten) der Zelllinien NIH3T3-pEJ, FE-8, 208F, Rose199 oder Rose A2-5 in einem Volumen von 150µl in 96 well Platten ausgesät. Das Zellwachstum wurde nach 24, 48 und 72 Stunden bestimmt. Dabei wurde die Umsetzung des gelben Tetrazoliumsalz XTT in das orangefarbene Formazan bei einer Wellenlänge von 490nm im Spektrophotometer gemessen.

2.2.2.7 Zellzyklus-Analyse nach Propidiumiodidfärbung der DNA

24 Stunden nach der zweiten Transfektion mit siRNA Duplexen wurden trypsinierte Zellen zweimal mit 1x PBS gewaschen und die DNA für mindestens 20 Minuten in 70% Ethanol fixiert. Danach wurden die Zellen kurz zentrifugiert und in Verdünnungspuffer resuspendiert. Nach Zugabe von 4µl RNase (10mg/ml) wurden die Proben für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Nun wurden die Zellen mit 20µg/ml Propidiumiodid gefärbt und die Proben in einem Durchflußzytometer (Coulter Epics) analysiert, wobei die Zuordnung der Zellen zu den einzelnen Zellzyklusstadien mittels Multicycle-Software (Coulter) erfolgte.

Verdünnungspuffer

0,1% Triton X-100

0,5% BSA

in 1x PBS

2.2.3 Arbeiten mit RNA

2.2.3.1 RNA Isolierung aus Säugetier-Zelllinien für RT-PCR

Die Isolierung von Gesamt-RNA aus den NIH3T3-pEJ Zellen wurde mit Hilfe des RNeasy Mini Kit (Qiagen) durchgeführt. Hierfür wurden die Zellen zunächst zweimal mit 1x PBS gewaschen und dann durch Zugabe des RLT-Puffers von den Zellkulturschalen gelöst. Das Zellysate wurde in 1,5ml Reaktionsgefäßen gesammelt und durch mehrmaliges Hoch- und Runterziehen durch eine Kanüle homogenisiert. Nach Zugabe eines Volumenäquivalents 70%igen Ethanols wurde die Lösung gut gemischt und auf eine RNeasy Säule gegeben. Die Säulen wurden für 15 Sekunden bei 8.000xg zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Die Probe wurde auf der Säule mit dem Puffer RW gewaschen. Um eine DNA-Kontamination zu verhindern, erfolgte ein DNase-Verdau (RNase-free DNase Set). Hierzu wurden 10µl der DNase Lösung mit 70µl RDD Puffer gemischt und auf die Säule pipettiert. Nach einer 15 minütigen Inkubation bei 25°C wurde der Verdau durch Zugabe von 350µl RW1 Puffer und einer Zentrifugation für 15 Sekunden bei 8.000xg gestoppt. Die Säulen wurden zweimal mit RPE-Puffer gewaschen und die RNA durch Zugabe von 40µl RNase-freiem Wasser und anschließender Zentrifugation für 1 Minute bei 8.000xg eluiert. Die RNA wurde bei –80°C gelagert.

2.2.3.2 Gesamt-RNA Isolierung aus Säugetier-Zelllinien für die Hybridisierung von cDNA-Arrays

Die Zellen wurden zweimal mit 1xPBS gewaschen und dann durch Zugabe von Trizol von den Zellkulturschalen gelöst. Das Zellysate wurde in 12ml Röhrchen überführt und durch mehrmaliges Pipettieren homogenisiert. Nach einer Inkubation für 5 Minuten bei RT wurde pro ml Zellysate 0,2ml Chloroform hinzugegeben und die Röhrchen für 15 Sekunden geschwenkt. Die Proben wurden für 4 Minuten bei RT stehen gelassen und danach für 15 Minuten bei 12.000xg und 4°C zentrifugiert. Die wässrige Oberphase wurde nun vorsichtig, ohne die Interphase zu berühren abgenommen und in ein neues 12ml Röhrchen transferiert. Pro ml Lösung wurden nun 0,5ml Isopropanol beigelegt und die Mischung geschwenkt bis sich keine Schlieren mehr bildeten. Die Proben wurden dann für 10 Minuten bei RT inkubiert und daraufhin für 20 Minuten bei 12.000xg und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 5ml 75%igem Ethanol gewaschen. Nach einer Zentrifugation bei 12.000xg und 4°C für 7 Minuten wurde der Überstand abgesaugt und die RNA kurz luftgetrocknet. Die RNA wurde in 100µl Wasser aufgenommen und für 10 Minuten bei 56°C inkubiert. Die Proben wurden über Nacht bei -80°C gelagert. Um eine möglichst hohe Qualität der RNA zu gewährleisten, wurde die RNA zusätzlich über RNeasy Säulen (Qiagen) aufgereinigt. Hierzu wurden zu den RNA-Proben 350µl RLT-Puffer und 250µl Ethanol gegeben. Das Gemisch wurde auf eine RNeasy-Säule gegeben und für 15 Sekunden bei 10.000xg und RT zentrifugiert. Die Säulen wurden zweimal mit RPE-Puffer gewaschen und die RNA durch Zugabe von 30µl H₂O und einer Zentrifugation für 1 Minute bei 10.000xg und RT eluiert. Die Proben wurden spektrophotometrisch gemessen und bei -80°C gelagert.

2.2.3.3 Photometrische Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration {Kaiser, 1960 #109}

Die Konzentration von Nukleinsäuren in wässriger Lösung wurde photometrisch durch Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von $\lambda=260\text{nm}$ (OD_{260}) und $\lambda=280\text{nm}$ (OD_{280}) in Quarzküvetten bestimmt. Eine OD_{260} von 1 entspricht einer Konzentration von 50µg/ml doppelsträngiger DNA, 27-35µg/ml einzelsträngiger DNA und 40µg/ml RNA. Der Reinheitsgrad einer Lösung kann durch den Quotienten $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ ermittelt werden. Reine DNA-Präparationen ergeben einen Wert von 1,8, reine RNA-Präparationen einen Wert von 1,5. Der Wert verändert sich bei Kontaminationen mit Proteinen oder Phenol.

2.2.3.4 RT-PCR

Für die Durchführung der RT-PCR wurde das Titan One Tube RT-PCR Kit verwendet. Dieses zeichnet sich dadurch aus, dass die reverse Transkription und die anschließende Amplifikation der cDNA in einem Reaktionsansatz stattfinden. Zunächst wurden für jede Probe zwei getrennte Ansätze pipettiert.

Ansatz I:

Komponente	Volumen	Endkonzentration
steriles H ₂ O	13.5µl	
dNTP Mix	4µl	0.2mM
DTT	2.5µl	5mM
RNase Inhibitor	1µl	5U
5'-Primer	1.5µl	0.4µM
3'-Primer	1.5µl	0.4µM
RNA (0.1µg/µl)	1µl	100ng RNA

Ansatz II:

Komponente	Volumen
steriles H ₂ O	14µl
5xRT-PCR Puffer	10µl
Enzymmix	1µl

Beide Ansätze wurden in einem 0,5 ml Reaktionsgefäß vereint und die anschließende RT-PCR in einem Thermocycler folgendermaßen durchgeführt:

Anzahl der Zyklen	Temperatur und Dauer
1x	50°C für 30 Minuten
1x	94°C für 2 Minuten
30x	94°C für 30 Sekunden x °C für 30 Sekunden 68°C für 1 Minute
1x	68°C für 5 Minuten

Die Proben wurden auf einem 2%igem Agarosegel analysiert.

2.2.3.5 Hybridisierung von Oligonukleotid-Mikro-Arrays

Auf alle hier verwendeten Oligonukleotid-Mikro-Arrays wurden cDNA-Fragmente mit einer Länge von ca. 300 Basenpaaren gespottet. Die Hybridisierungen wurden von Anita Geflitter (LFGC, Charite) durchgeführt. Dazu wurde der Array 50 Expression Array Detection Kit (Genisphere) für Mikroarrays verwendet.

2.2.3.5.1 cDNA Synthese

Zunächst wurde der RNA-RT Primer Mix angesetzt. Hierzu wurden 20µg Gesamt-RNA (s. Abschnitt 2.2.4.6) mit 1µl RT Primer gemischt und mit Nuklease-freiem Wasser auf ein Endvolumen von 23µl gebracht. Der Mix wurde für 10 Minuten bei 80°C inkubiert, auf Eis abgekühlt und dann 1µl Suprase-InTM RNase Inhibitor hinzugegeben (Probe 1). In einem separaten 0.5ml Reaktionsgefäß wurde dann der Reaktionsmix angesetzt. Hierzu wurden 8µl 5xSuperScript II First Strand Puffer mit 2µl dNTP Mix (10mM dATP, dCTP, dGTP und dTTP), 4µl 0.1M DTT und 2µl Superscript II Enzym gemischt. Die 16µl des Reaktionsmixes wurden zu den 24µl des RNA-RT Primer Mix gegeben und für 2 Stunden bei 42°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 7µl 0.5M NaOH/50mM EDTA gestoppt und für 10 Minuten bei 65°C denaturiert. Durch die Zugabe von 10µl 1M Tris-HCl pH 7.5 wurde die Reaktion neutralisiert (Probe 2). Die beiden Proben wurden miteinander kombiniert und 16µl 10mM Tris HCl pH 8.0/1mM EDTA hinzugefügt. Um die cDNA nun zu konzentrieren, wurden die Proben über Millipore Microcon YM-30 Centrifugal Filter aufgereinigt.

2.2.3.5.2 cDNA Hybridisierung

Die Hybridisierung erfolgte auf Poly-l-Lysin beschichteten Objektträger und mit einem SDS-basierten Hybridisierungspuffer. Der Hybridisierungsansatz bestand aus folgenden Komponenten:

10µl cDNA

12.5µl 2x Hybridisierungspuffer (bei 65°C für 10 Minuten vorgewärmt)

2µl LNA dT Blocker

8µl Nuklease-freies H₂O

1µl denaturierte Cot-I Maus DNA

Nach kurzem Vortexen und Zentrifugation wurden die Proben für 10 Minuten bei 78°C und anschließend für 17 Minuten bei 58°C inkubiert. Der Mix wurde dann auf die vorgewärmten Arrays gegeben und für 16 Stunden bei 64°C inkubiert.

2.2.3.5.3 Waschen der cDNA-Hybridisierung

Um ungebundene cDNA Moleküle zu entfernen, wurden die Mikroarrays wie folgt gewaschen:

- 1) 20 Minuten bei 63°C mit 2x SSC/ 0.2% SDS
- 2) 15 Minuten bei RT mit 2x SSC
- 3) 15 Minuten bei RT mit 0.2x SSC
- 4) 2 Minuten bei RT mit 95% Ethanol

Danach wurden die Objektträger durch Zentrifugation getrocknet.

2.2.3.5.4 3DNA Hybridisierung

Bei der 3DNA Array Kit Labeling Methode erfolgt die Markierung der zu hybridisierenden Proben nicht während der reversen Transkription durch den Einbau fluoreszierender Nukleotide. Die bei der reversen Transkription verwendeten Primer besitzen zusätzliche Sequenzanhänge, an die nach erfolgter Hybridisierung der cDNA auf den Mikroarray, komplementäre mit Cy3 oder Cy5 markierte Moleküle binden können.

Zunächst wurde der 2x Hybridisierungspuffer für 10 Minuten bei 65°C inkubiert. Die Zugabe von Anti-Fade Lösung sollte das Verblassen der Fluoreszenz reduzieren. Auch die 3DNA-Capture Lösung musste vor Gebrauch für 10 Minuten bei 53°C inkubiert werden.

Der Hybridisierungsmix setzte sich folgendermaßen zusammen:

20µl 2x Hybridisierungspuffer (+ 1µl Anti-Fade Lösung)

2.5µl 3DNA Cy3

2.5µl 3DNA Cy5

15µl H₂O

1µl Cot-I Maus DNA (denaturiert)

Nach einer Inkubation für 10 Minuten bei 78°C und für 17 Minuten bei 58°C wurde der Hybridisierungsmix auf die vorgewärmten Arrays gegeben. Diese wurden dann für 3 Stunden bei 64°C inkubiert.

2.2.3.5.5 Waschen der 3DNA Hybridisierung

Um die nicht gebundenen Farbstoffmoleküle zu entfernen, wurden die Arrays nach folgendem Protokoll gewaschen:

- 1) 20 Minuten bei 63°C mit 2x SSC/0.2% SDS/1mM DTT

2) 15 Minuten bei RT mit 2x SSC/1mM DTT

3) 15 Minuten bei RT mit 0.2 SSC

Die Arrays wurden mittels Zentrifugation getrocknet und gescannt.

2.2.3.5.6 Auswertung der Mikroarrays

Die Auswertung der gescannten Arrays erfolgte mit den beiden Computerprogrammen ImaGENE und Genesight (beide von Biodiscovery, El Segundo, CA; USA) und wurde von Herrn Dr. Oleg Tchernitsa durchgeführt.

2.2.4 Arbeiten mit Proteinen

2.2.4.1 *Proteinextraktion*

2.2.4.1.1 Isolierung von Gesamtproteinextrakten

Die Zellkulturplatten wurden während der ganzen Prozedur auf Eis gehalten, um eine Degradation der Proteine zu verhindern. Nach zweimaligem Waschen der Zellen mit eiskaltem 1x PBS, wurde ein der Zellzahl angepasstes Volumen an Lysispuffer hinzugegeben. Die Platten wurden für 30 Minuten auf Eis stehen gelassen und danach 1 Volumen 2x SDS-Sample-Puffer hinzugefügt. Die Zellen wurden von der Oberfläche abgeschabt und in ein 1,5ml Reaktionsgefäß überführt. Nachdem die Proben 10 Minuten im Wasserbad gekocht waren, wurden sie für 10 Minuten bei 17.900xg und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde in 100µl Aliquots aufgeteilt und bei -20°C gelagert.

Lysispuffer

60µl 1M Tris-HCl pH 7.2

180µl 1M NaCl

60µl Triton X-100

0,06g Natriumdeoxycholate

ad 6ml mit H₂O

Zugabe von Inhibitoren:

20µl/ml PMSF

2xSDS-Sample-Puffer:

50mM Tris-HCl pH 6.8

100mM DTT

2% w/v Glycerol

0.1% w/v Bromphenolblau

10µl/ml Natriumorthovanadate

40µl/ml Aprotinin

2.2.4.1.2 Isolierung von membranständigen Proteinen

Die Zellen wurden zunächst zweimal mit eiskaltem 1x PBS gewaschen und dann für 10 Minuten in Hypolysis-Puffer auf Eis inkubiert. Das Lysat wurde in Dounce Homogenisatoren überführt. Durch mehrmaliges Hoch- und Runterziehen wurden die Zellstrukturen zerstört, es wurde darauf geachtet, dass die Zellkerne intakt blieben. Das Homogenisat wurde in 12ml Röhrchen überführt und für 10 Minuten bei 1.000xg und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde in Beckman Röhrchen (13x15mm) transferiert und für 30 Minuten bei 100.000xg und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde in 50-100µl 1x SDS-Sample-Puffer aufgenommen und für 10 Minuten im Wasserbad gekocht. Die Proben wurden für 10 Minuten bei 17.900xg und 4°C zentrifugiert und der Überstand aliquotiert. Die Proteine wurden bei -20°C gelagert.

Hypolysis Puffer

10mM Tris-HCl pH 8.0

0,1mM DTT

1 Tablette/ 20ml Protease Inhibitor complete™ Tabletten

2.2.4.1.3 Isolierung von Kern- und Zytoplasmaproteinen {Patturajan, 2002 #184}

Die Zellen wurden zunächst zweimal mit eiskaltem 1x PBS gewaschen. Nach Zugabe von Puffer A wurden die Zellkulturplatten für 20 min bei 4°C geschwenkt. Die Proben wurden in Dounce Homogenisatoren überführt und die Zellen durch 12 maliges Hoch und Runterziehen aufgeschlossen. Das Homogenisat wurde in 12ml Röhrchen überführt und für 5 Minuten bei 3.000xg zentrifugiert. Der Überstand wurde durch eine Zentrifugation für 30 Minuten bei 15.000xg und 4°C gereinigt und enthielt die zytoplasmatischen Proteine. Das Pellet wurde in Puffer A1 aufgenommen und die Suspension mit 1 Volumen Puffer C gemischt. Die gereinigten Zellkerne wurden mittels Zentrifugation für 45 Minuten bei 78.000xg und 4°C gesammelt und anschließend in 50-100µl Puffer B resuspendiert.

Puffer A

10mM KCl

Puffer A1

Puffer A + 0.3%Nonidet P-40

10mM Tris-HCl pH 7.9

1mM DTT

250mM Saccharose

60µM PMSF

proteinase inhibitor cocktail (Roche)

Puffer B

20mM HEPES pH 7.9

1mM EDTA

1mM EGTA

1mM DTT

1mM PMSF

400mM NaCl

proteinase inhibitor cocktail (Roche)

Puffer C

10mM Tris-HCl pH 8.0

2.2mM Saccharose

5mM Magnesium-Acetat

0.1mM EDTA

2.2.4.1.4 Isolierung von Gesamtproteinen unter Verwendung von CHAPS-Puffer

Um die Expression verschiedener Caspasen nach Inhibition der Raf-Isoformen zu untersuchen, wurden die Proteine mittels eines speziellen Protokolls isoliert. Hierzu wurden die Zellkulturplatten zunächst zweimal mit 1xPBS gewaschen und die Zellen in dem restlichen 1xPBS abgekratzt. Die Zellen wurden bei 1.000xg und 4°C für 5 Minuten abzentrifugiert und das Pellet in 50µl CHAPS-Puffer aufgenommen. Die Proben wurden dann dreimal bei –20°C eingefroren und wieder aufgetaut und für 10 Minuten bei 14.000xg und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde mit 1 Volumen 2xSDS-Sample-Puffer gemischt und die Proben für 10 Minuten im Wasserbad gekocht. Nach einer kurzen Zentrifugation wurden die Proben aliquotiert und bei –20°C gelagert.

CHAPS-Puffer

50mM PIPES/NaOH pH 6.5

2mM EDTA

0.1% CHAPS

5mM DTT

20µg/ml Leupeptin

1mM PMSF

10µg/ml Pepstadin

10µg/ml Aprotinin

2.2.4.1.5 Isolierung von Gesamtproteinen unter Verwendung von SDS-Sample-Puffer

Für die Expressionanalyse des Proteins Bcl-xl wurden die Zellkulturschalen zunächst zweimal mit 1xPBS gewaschen und das restliche 1xPBS abgesaugt. Nach Zugabe von 1xSDS-Sample-Puffer wurden die Zellen abgekratzt und in 1.5ml Reaktionsgefäße überführt. Die Proben wurden für 15 Sekunden ins Ultraschallbad gestellt und anschließend für 10 Minuten im Wasserbad gekocht. Nachdem die Proben kurz abzentrifugiert wurden, wurden sie bei -20°C gelagert.

2.2.4.2 Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mittels der Amidoschwarzmethode {Schaffner, 1973 #205}. Hierzu wurde zunächst eine BSA-Konzentrationsreihe (0.5-10mg/ml) angesetzt, die zur Einstellung der Eichkurve eingesetzt wurde. Je 1µl der BSA- und der Proteinproben wurden auf eine Protran- Membran (Schleicher & Schüll) aufgetropft. Die Membran wurde für 1 Minute mit Amidoschwarz gefärbt und dann für circa 10 Minuten mit Destain gewaschen, so lange bis nur noch der an die Proteine gebundene Farbstoff vorhanden war. Die Spots wurden mit einem Skalpell ausgeschnitten und in 800µl Elution gegeben. Die Proben wurden für 30 Minuten bei RT auf dem Thermomixer geschüttelt und danach bei einer Wellenlänge von 630nm photometrisch gemessen.

Amidoschwarz

0.1% in 45% Methanol

10% Essigsäure

Destain

90% Methanol

2% Essigsäure

Elution

50% Ethanol

50µM EDTA

25mM NaOH

2.2.4.3 Eindimensionale SDS Gelelektrophorese (PAGE)

Die Proteinproben wurden mittels Elektrophorese durch ein Polyacrylamid-Gel aufgetrennt. Für den Nachweis der Ras-Expression wurden 10µg membranständige Proteine und ein 16%iges Trenngel verwendet, in allen anderen Experimenten wurden 20µg Proteine und ein 12%iges Trenngel benutzt. Die Elektrophorese erfolgte solange sich die Proben im Sammelgel befanden bei 65 V und 400mA in 1x Laufpuffer. Sobald die Proben ins Trenngel gelaufen waren, wurde die Spannung auf 110V erhöht.

4%iges Sammelgel

6.1ml H₂O

2.5ml 0.5M Tris-HCl pH 6.8

50µl 20% SDS

1.33ml 30% Acrylamid/Bisacrylamid

50µl 10% APS

10µl TEMED

16%iges Trenngel

2ml H₂O

2.5ml 1.5M Tris-HCl pH 8.7

50µl 20% SDS

5.3ml 30% Acrylamid/Bisacrylamid

50µl 10%APS

10µl TEMED

12%iges Trenngel

3.35ml H₂O

2.5ml 1.5M Tris-HCl pH 8.7

50µl 20% SDS

4ml 30% Acrylamid/Bisacrylamid

50µl 10% APS

5µl TEMED

1x Laufpuffer

15.1g/l Tris-Base

75g/l Glycin

5g/l SDS

2.2.4.4 Westernblot Analyse

Nach der Elektrophorese wurde das Sammelgel verworfen und das Trenngel für 15 Minuten in 1x Transfer-Puffer inkubiert. Eine PVDF-Membran wurde auf die Größe des Gels zurechtgeschnitten und für 10 Sekunden in Methanol geschwenkt. Um das Methanol von der Membran zu entfernen, wurde sie für 1 Minute in Wasser geschüttelt und danach für 10 Minuten in 1x Transfer-Puffer inkubiert. Der Transfer erfolgte in einem Bio-Rad Transblot Gerät. Auf drei, mit 1x Transfer-Puffer angefeuchtete Whatman-Papiere wurde das Gel und anschließend die Membran gelegt. Die oberste Schicht bildeten wieder drei mit 1x Transfer-Puffer angefeuchtete Whatman-Papiere. Der Transfer erfolgte bei 17V, wobei die Dauer des Transfers von der Größe des nachzuweisenden Proteins abhing (37- 60 Minuten). Nach dem Transfer wurde die Membran für 1 Stunde in 5% Magermilch in TBST bei Raumtemperatur und unter Schwenken blockiert. Nachdem die Magermilch mit 1xTBST vollständig von der Membran gewaschen wurde, wurde die Membran mit dem ersten Antikörper inkubiert. Die verwendeten Verdünnungen und die Inkubationsdauer sind der Tabelle zu entnehmen. Nach der Inkubation mit dem ersten Antikörper wurde die Membran dreimal für 20 min mit 1x TBST gewaschen und dann für 1 Stunde bei Raumtemperatur mit dem entsprechenden zweiten Antikörper inkubiert. Auch nach dem zweiten Antikörper wurde die Membran dreimal für 20 Minuten mit 1xTBST gewaschen. Um die Antigene, die an die Membran gebunden wurden nun zu detektieren, wurde die nicht-radioaktive Methode der ECL Western blotting detection reagents verwendet. Dazu wurden die Reagenzien des Chemolumineszenz-Sets (=ECL-Kit) im Verhältnis 1:1 gemischt und die Nitrocellulosemembran für 1 Minute damit inkubiert. Abschließend erfolgte die Detektion des Signals unter Verwendung des Lumi-Imager-Systems. Das Gel wurde für 30 Minuten in einer Comassie-Blau-Lösung gefärbt und anschließend mit 40% Methanol und 10% Essigsäure entfärbt. Zur Kontrolle der gleichmäßigen Beladung wurde das Gel fotografiert.

Antikörper (Verdünnung in)	Verdünnung (Inkubationsdauer)	2. Antikörper	Verdünnung
anti-Ras (1xTBST)	1:850 (1 Std. RT)	Peroxidase-conjugate goat anti-mouse	1: 10000

anti-Raf-1 (5%BSA/1xTBST)	1:1000 (ü.N. 4°C)	Peroxidase-conjugate goat anti-rabbit	1:20000
anti-Mek1 (5%BSA/1xTBST)	1: 1000 (ü.N. 4°C)	Peroxidase-conjugate goat anti-rabbit	1:20000
anti-Mek2 (5%BSA/1xTBST)	1:1000 (ü.N. 4°C)	Peroxidase-conjugate goat anti-rabbit	1:20000
anti-phospho-Mek1/2 (5%BSA/1xTBST)	1:1000 (ü.N. 4°C)	Peroxidase-conjugate goat anti-rabbit	1:20000
anti-p42/p44-Mapk (5%BSA/ 1xTBST)	1:1000 (ü.N. 4°C)	Peroxidase-conjugate goat anit-rabbit	1:20000
anti- Erk1 (1xTBST)	1:5000 (1 Std. RT)	Peroxidase-conjugate goat anti-mouse	1:10000
anti-phospho-Elk (Ser383) (5%BSA/1xTBST)	1:1000 (ü.N. 4°C)	Peroxidase-conjugate goat anti-rabbit	1:20000
anti-phospho-NFκB (Ser536) (5%BSA/1xTBST)	1:1000 (ü.N. 4°C)	Peroxidase-conjugate goat anti-rabbit	1:20000
anti-p70 S6 kinase (Thr421/Ser424) (5%BSA/1xTBST)	1:1000 (ü.N. 4°C)	Peroxidase-conjugate goat anti-rabbit	1:20000
anti-Creb-1 (5%BSA/1xTBST)	1:1000 (ü.N. 4°C)	Peroxidase-conjugate goat anti-rabbit	1:20000
anti-Cyclin D1 (5%BSA/1xTBST)	1:1000 (ü.N. 4°C)	Peroxidase-conjugate goat anti-mouse	1:20000
anti-phospho-PKC epsilon (5%BSA/1xTBST)	1:1000 (ü.N. 4°C)	Peroxidase-conjugate goat anti-rabbit	1:20000
anti-phospho-PKC delta (Thr643) (5%BSA/1xTBST)	1:1000 (ü.N. 4°C)	Peroxidase-conjugate goat anti-rabbit	1:20000
anti-phospho-PKC alpha (5%BSA/1xTBST)	1:1000 (ü.N. 4°C)	Peroxidase-conjugate goat anti-rabbit	1:20000
anti-phospho-PKC pan (5%BSA/1xTBST)	1:1000 (ü.N. 4°C)	Peroxidase-conjugate goat anti-rabbit	1:20000
anti-phospho-Bad (Ser136) (5%BSA/1xTBST)	1:500 (ü.N. 4°C)	Peroxidase-conjugate goat anti-rabbit	1:20000
anti-Bcl-xl (5% Magermilch)	1:1000 (ü.N. 4°C)	Peroxidase-conjugate goat anti-rabbit	1:20000
anti-cleaved-caspase 9 (5% Magermilch)	1:1000 (ü.N. 4°C)	Peroxidase-conjugate goat anti-rabbit	1:20000
anti-caspase 3 (5% Magermilch)	1:800 (ü.N. 4°C)	Peroxidase-conjugate goat anti-rabbit	1:20000
anti-cleaved-caspase 3 (5% Magermilch)	1:800 (ü.N. 4°C)	Peroxidase-conjugate goat anti-rabbit	1:20000
Anti-cleaved-caspase 7 (5% Magermilch)	1:800 (ü.N. 4°C)	Peroxidase-conjugate goat anti-rabbit	1:20000
anti-Parp (5%Magermilch)	1:800 (ü.N. 4°C)	Peroxidase-conjugate goat anti-mouse	1:10000
anti-Ral A (1xTBST)	1:1000 (1Std. RT)	Peroxidase-conjugated goat anti-mouse	1:10000
anti-Fra-1 (R20) (5% Magermilch)	1:200 (ü.N. 4°C)	Peroxidase-conjugate goat anti-rabbit	1:20000
anti-Odc (5%BSA/1xTBST)	1:500 (ü.N. 4°C)	Peroxidase-conjugated goat anti-goat	1:20000

anti-phospho-PKR (Thr446/451) (5%BSA/1xTBST)	1:1000 (ü.N. 4°C)	Peroxidase-conjugate goat anti-rabbit	1:20000
anti-STAT1 (5%BSA/1xTBST)	1:1000 (ü.N. 4°C)	Peroxidase-conjugate goat anti-rabbit	1:20000
anti-phospho-STAT1 (Tyr701) (5%BSA/1xTBST)	1:1000 (ü.N. 4°C)	Peroxidase-conjugate goat anti-rabbit	1:20000
anti-phospho-eIF2 α (5%BSA/1xTBST)	1:1000 (ü.N. 4°C)	Peroxidase-conjugate goat anti-rabbit	1:20000
anti-Histon H3 (5%BSA/1xTBST)	1:1000 (ü.N. 4°C)	Peroxidase-conjugated goat anti-rabbit	1:20000
anti-pan-actin (1xTBST)	1:5000 (1Std. RT)	Peroxidase-conjugate goat anti-mouse	1:10000

1x Transfer-Puffer

25mM Tris-Base

0.2M Glycin

20% Methanol

1xTBST

10mM Tris-HCl pH 8.0

150mM NaCl

0.05% w/v Tween-20

Comassie-Blau-Lösung

0.1% Comassie blau R-250 in 40% Methanol und 10% Essigsäure

Die auf der Membran gebundenen Antikörper wurden unter Verwendung des Western Blot recycling Kit entfernt. Hierbei wurden die Membranen zunächst für 45 Minuten in Stripping Solution und dann für zweimal 5 Minuten in Blocking Solution geschwenkt. Nachdem die Membranen kurz mit 1xTBST gewaschen wurden, konnten sie mit einem neuen Antikörper inkubiert werden.

3 Ergebnisse

3.1 Die Inhibition von HRAS-V12 durch siRNAs führt zu einem G1 Zellzyklus Arrest

Die Inhibition der Ras Expression führt in verschiedenen Tumorzelllinien zur Hemmung der Proliferation. Dies wurde z.B. durch die Transfektion dominant-negativer Mutanten {Ogiso, 1994 #175} {Shichinohe, 1996 #222} {Senmaru, 1998 #214} {Takeuchi, 2000 #243} {Watanabe, 2000 #265}, durch homologen Rekombination {Shirasawa, 1993 #224}, durch die Transfektion von antisense Konstrukten {Mukhopadhyay, 1991 #165} {Georges, 1993 #69} {Zhang, 1993 #284} {Aoki, 1995 #9} oder durch die Applikation von Farnesyltransferase-Inhibitoren {Kohl, 1994 #120} gezeigt.

Um zu testen, ob diese Ergebnisse unter Verwendung der RNA Interferenz Technologie bestätigt werden können und somit den Gebrauch von siRNA Duplexen in NIH3T3-pEJ, FE-8 und EJ Zellen zu etablieren, wurden zunächst siRNAs spezifisch gegen das humane HRAS-V12 Onkogen verwendet.

3.1.1 Design der siRNA Duplexe

Ein wichtiges Kriterium für ein erfolgreiches RNA Interferenz Experiment ist das Design der siRNA Duplexe. Zu Beginn dieser Arbeit existierten noch relativ wenige Daten über die optimale Sequenzbeschaffenheit der Duplexe. Die Zielsequenz wurde so ausgewählt, dass sie einen CG-Gehalt von 50-70% aufwies und innerhalb des kodierenden Bereiches des jeweiligen Gens lag. Da zu diesem Zeitpunkt noch kein Programm für das Design von siRNA Duplexen zur Verfügung stand, wurden die in diesem Abschnitt verwendeten siRNAs per Hand ausgewählt.

Die Duplexe spezifisch für humanes, onkogenes HRAS-V12 bzw. HRAS-Wildtyp umspannen die Region, in der die aktivierende Mutation liegt (Abbildung 4). Diese beiden Duplexe unterscheiden sich also nur durch eine Base an Position 5 des Sense Stranges. Gegenüber der Ratten- bzw. der Maus-mRNA weisen die beiden Duplexe dagegen 4 bzw. 5 Basenunterschiede auf.

HRAS-WT mRNA	aagctggtggtggtggggc	g	ccggcggtgtgggcaagagt	g									
HRAS-WT Protein	K	L	V	V	V	G	A	G	G	V	G	K	S
HRAS-V12 mRNA	aagctggtggtggtggggc	g	ccgctcggtgtgggcaagagt	g									
HRAS-V12 Protein	K	L	V	V	V	G	A	V	G	V	G	K	S

Abbildung 4: Protein- und mRNA-Sequenz von HRAS-WT und HRAS-V12. Die Punktmutation an Position 12 der Aminosäuresequenz ist Rot hervorgehoben. Die Zielsequenz der jeweiligen siRNA Duplex ist durch grüne Buchstaben dargestellt.

Um den Effekt weiterer Basenaustausche auf die Inhibitionseffizienz zu untersuchen, wurden zwei siRNA Duplexe synthetisiert, die zusätzlich zu dem Basenaustausch an Position 5 des Sinnstranges noch eine weitere Base gegenüber dem Wildtyp verändert hatten. Dabei unterscheiden sich die beiden Duplexe in der Lokalisation der zweiten Mutation.

Im Duplex HRAS-2M liegt die zweite Mutation an Position 6 des Sinnstranges, die beiden Basenaustausche liegen also direkt nebeneinander (Abbildung 5). Dagegen wurde im siRNA Duplex HRAS-2MS die zweite Mutation an Position 15 des Sinnstranges eingeführt (Abbildung 5).

HRAS - V12 - siRNA	5´	- GCCGUCGGUGUGGGCAAGA	- 3´
HRAS - WT - siRNA	5´	- GCCG G CCGUGUGGGCAAGA	- 3´
HRAS - 2MS - siRNA	5´	- GCCG G CCGUGUGGG G AAGA	- 3´
HRAS - 2M - siRNA	5´	- GCCG GG GGUGUGGGCAAGA	- 3´

Abbildung 5: Sequenzen des Sinnstranges der gegen HRAS-V12 bzw. HRAS-WT gerichteten Duplexe. Die jeweiligen Basenaustausche sind durch rote Buchstaben markiert.

Um auszuschließen, dass die Effekte auf die Ras Expression nur Artefakte der Transfektion mit siRNA Duplexen sind, wurden zwei siRNA Kontrollduplexe synthetisiert, deren Sequenz im Material und Methoden Teil (s.S. 14) aufgeführt ist. Der gegen das humane, onkogene KRAS-V12 gerichtete Duplex weist 9, über die gesamte Sequenz verteilte Basenaustausche gegenüber der HRAS-V12 Sequenz auf. Die zweite Kontroll-siRNA wurde gegen EGFP gerichtet und besitzt somit keine endogene Zielsequenz.

Um sicher zu gehen, dass durch die siRNA Duplexe keine anderen Gene neben der Ziel-mRNA in ihrer Expression inhibiert werden, wurden die Sequenzen einer Blast-Analyse (www.ncbi.nlm.nih.gov) unterzogen. Es wurden nur solche Duplexe verwendet, die in weniger als 16 Basenpaaren eine Homologie zu einer anderen endogenen mRNA aufwiesen. Im Laufe der Zeit wurden allerdings einige Arbeiten zur Spezifität der siRNAs veröffentlicht, die zeigen konnten, dass eine Homologie von nur 11 aufeinanderfolgenden Basenpaaren für eine Degradation der entsprechenden mRNA ausreicht {Jackson, 2003 #100}.

3.1.2 Analyse der Ras Expression nach Transfektion mit siRNA-Duplexen spezifisch gegen HRAS-V12

Die Inhibition des HRAS-V12 Proteins wurde in drei verschiedenen Zellsystemen untersucht, in der Mausfibroblasten Zelllinie NIH3T3-pEJ, in der Rattenfibroblasten Zelllinie FE-8 und in der humanen Blasenkarzinomzelllinie EJ. NIH3T3-pEJ und FE-8 Zellen entstanden durch Transfektion und Transformation der immortalen Zelllinien NIH3T3 und 208F mit einem aktivierten, humanen HRAS-V12 {Seliger, 1991 #212} {Griegel, 1986 #77}. Im Gegensatz dazu besitzt die EJ Zelllinie eine endogene HRAS-V12-Mutation {Parada, 1982 #181}. Aus dieser Zelllinie wurde 1982 das humane HRAS-V12 Onkogen unter der Bezeichnung EJ erstmals isoliert {Parada, 1982 #181}.

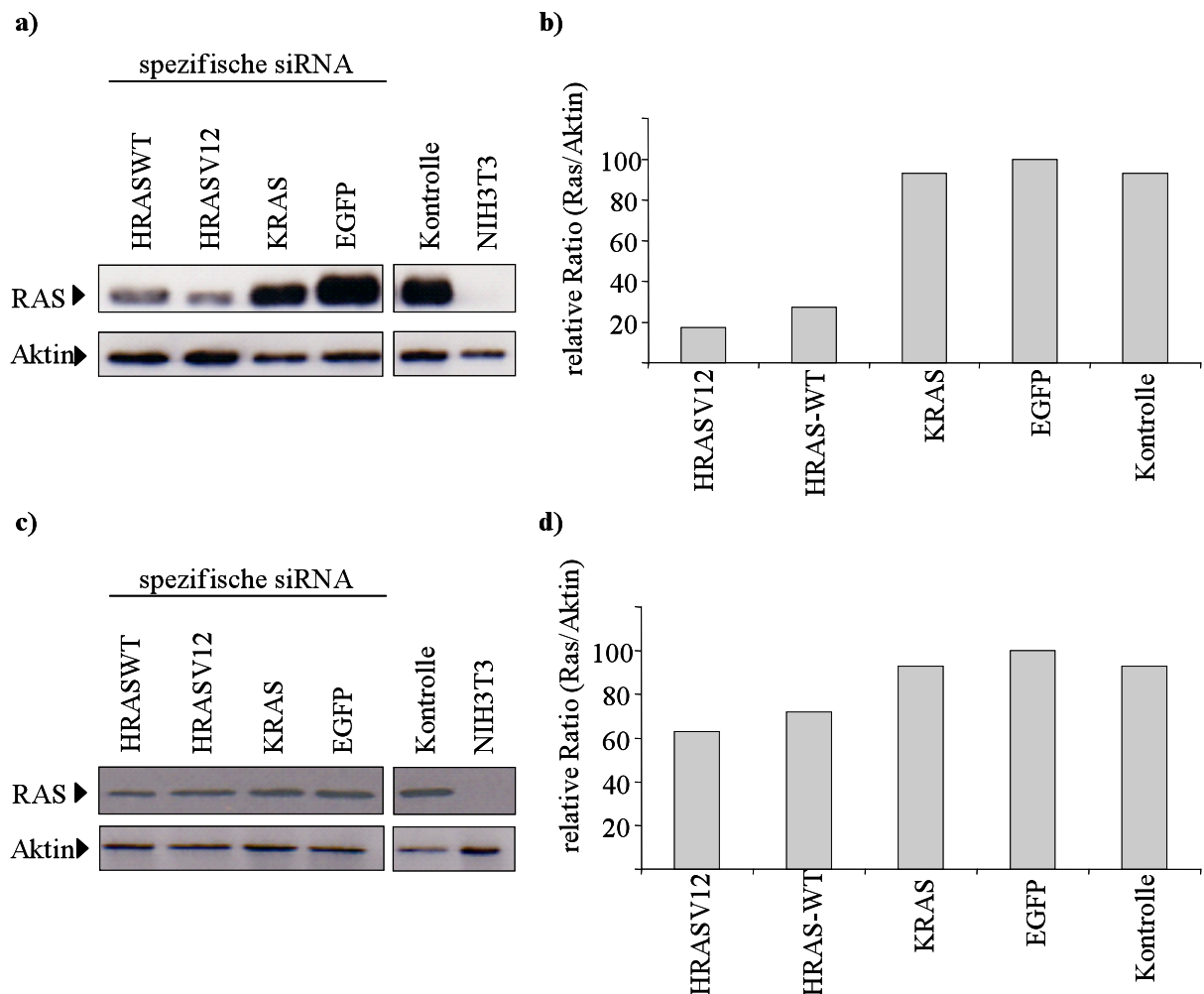


Abbildung 6: Western Blot Analyse der Ras Expression in NIH3T3-pEJ Zellen 8 Stunden (a) und 28 Stunden (c) nach der zweiten Transfektion mit siRNA Duplexen spezifisch gegen HRAS-V12, HRAS-WT, KRAS und EGFP und in untransfizierten NIH3T3-pEJ Zellen (Kontrolle). Zusätzlich wurden noch Proteinextrakte der immortalen NIH3T3 Zellen aufgetragen. Als Ladungskontrolle diente ein anti-Aktin Antikörper. Die Reduktion der Ras Expression wurde über Phospho-Image Analyse semiquantitativ bestimmt (b, d). In den Diagrammen ist der Quotient zwischen der Ras Bandenintensität und der Aktin Bandenintensität jeder einzelnen Probe dargestellt. Die Probe mit dem höchsten Quotienten wurde gleich 100% gesetzt und die anderen Quotienten dazu in Relation gesetzt.

Die Transfektion von HRAS-V12-spezifischen siRNA Duplexen führt in den Zelllinien NIH3T3-pEJ, FE-8 und EJ zu einer starken Reduktion der Ras Expression. So konnte die Menge an Ras Protein in den NIH3T3-pEJ Zellen um etwa 80% reduziert werden (Abbildung 6a,b). Im Gegensatz dazu zeigten die HRAS-V12 spezifischen siRNAs in den FE-8 und den EJ Zellen eine leicht verminderte Effizienz. Hier konnte die Ras Expression um 60% bzw. 70% reduziert werden (Abbildung 7a,b;Abbildung 8a,b). Die Wirkung der Ras Inhibition durch die spezifische siRNA setzt verhältnismäßig schnell ein. Der starke Einfluss auf die Ras Expression konnte schon 8 Stunden nach der zweiten Transfektion festgestellt werden. Im Gegensatz dazu ist die Ras Expression 28 Stunden nach der zweiten Transfektion je nach Zelllinie nur noch um 30-40% herabgesetzt (Abbildung 6c,d;Abbildung 7c,d;Abbildung 8c,d).

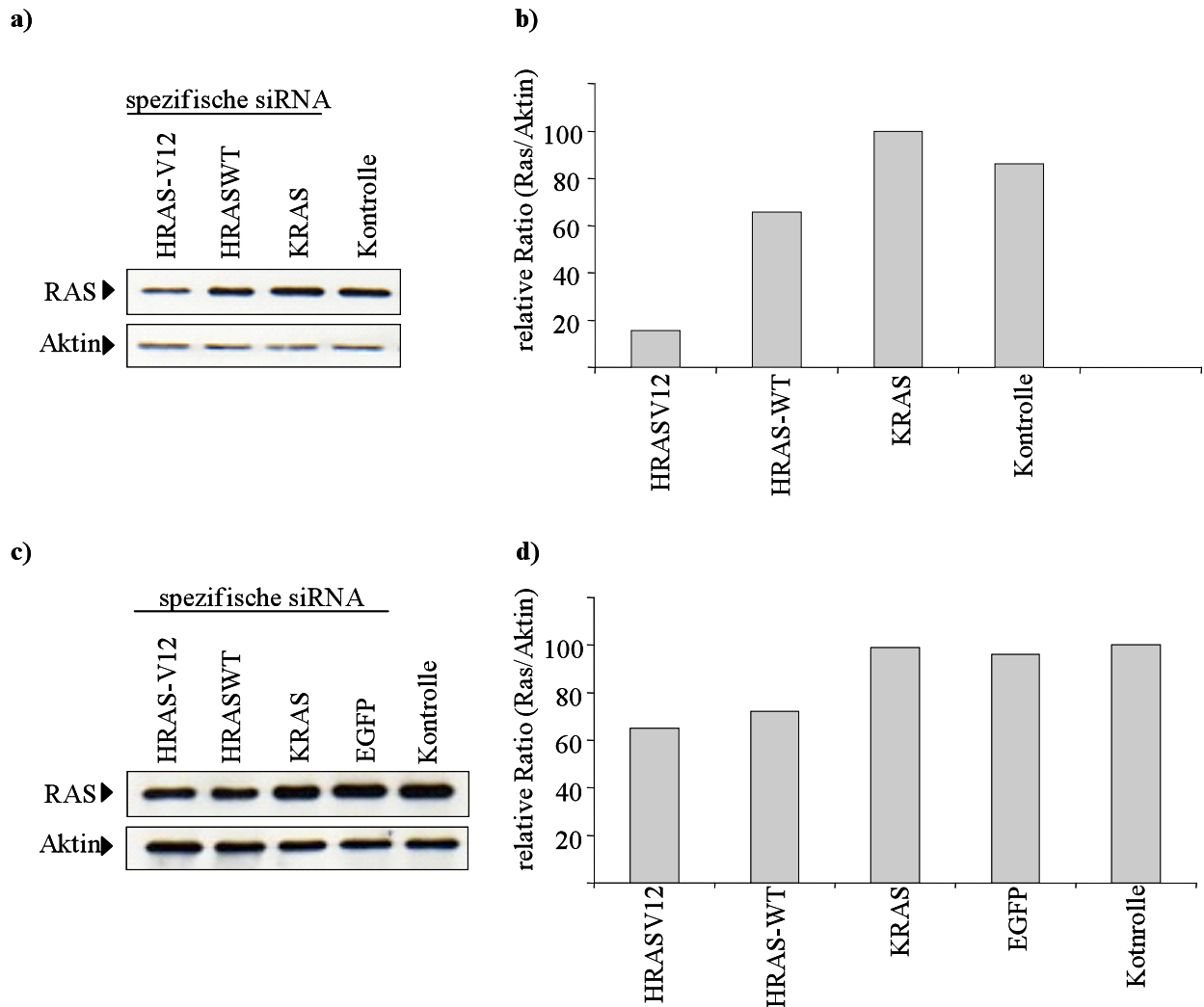


Abbildung 7: Western Blot Analyse der Ras Expression in FE-8 Zellen. Die Zellen wurden zweimal im Abstand von 24 Stunden mit siRNAs spezifisch gegen HRAS-V12, HRAS-WT, KRAS und EGFP transfiziert. Membranständige Proteine wurden 8 Stunden (a) und 28 Stunden (c) nach der zweiten Transfektion präpariert. Die Westernblots wurden zusätzlich noch mittels Phospho-Image Analyse semiquantitativ ausgewertet (b, d). Die Balken stellen die Quotienten zwischen der Stärke des Ras Signals und der Aktinkontrolle relativ zum höchsten Quotienten dar.

Die ersten Publikationen, die sich mit der Anwendung der RNA Interferenz zur gezielten Ausschaltung von Zielgenen befassten postulierten, dass es sich bei dieser Methode um einen sehr spezifischen Mechanismus handelt. So konnte gezeigt werden, dass ein einziger Basenaustausch im Vergleich zur Zielsequenz die Inhibition vollständig aufhebt {Agami, 2000 #301}.

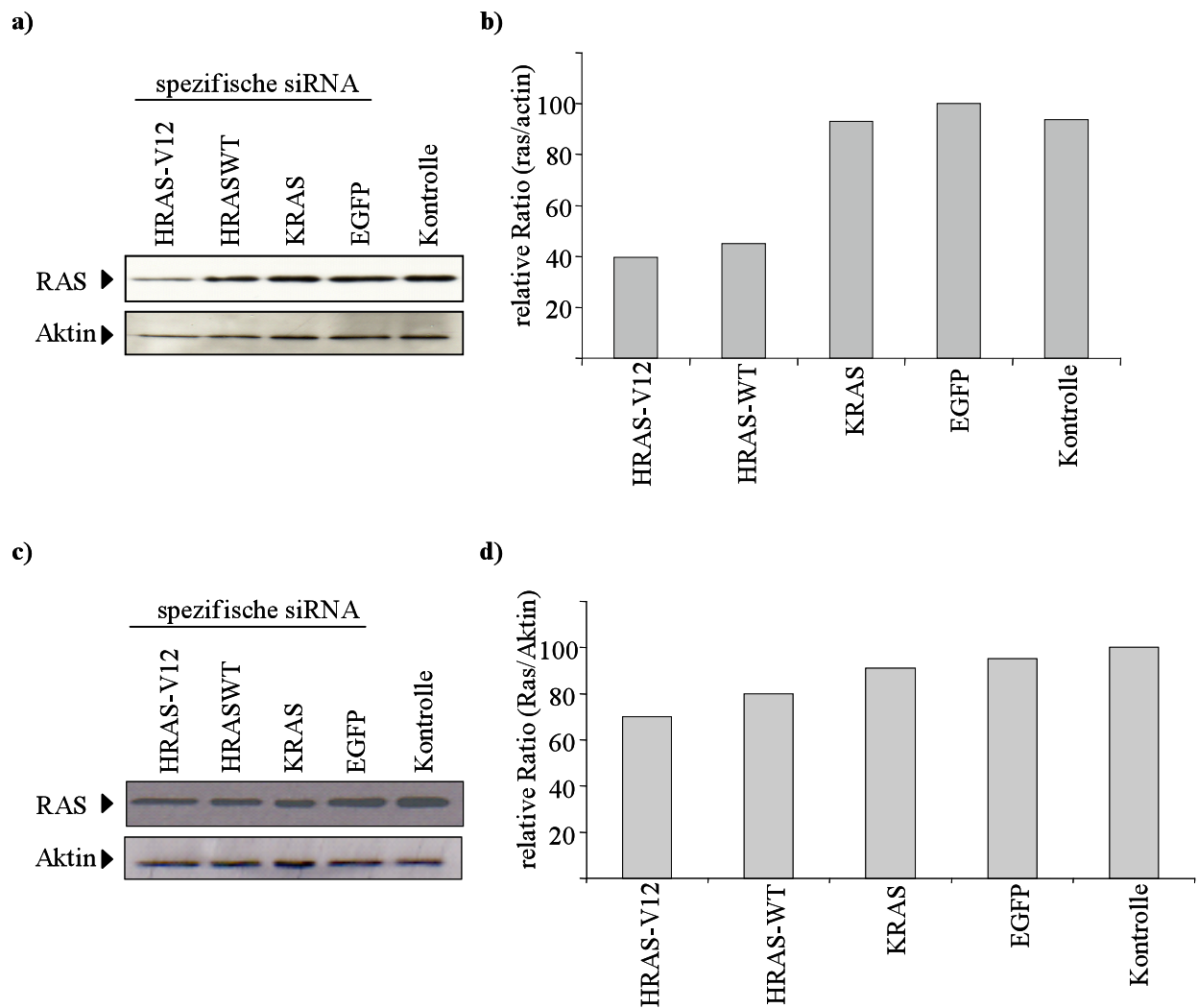


Abbildung 8: Westernblot Analyse der Ras Expression in humanen EJ Zellen. Die Zellen wurden zweimal im Abstand von 24 Stunden mit siRNA Duplexen spezifisch gegen HRAS-V12, HRAS-WT, KRAS und EGFP transfiziert oder nur mit dem Transfektionsreagenz Oligofectamine behandelt (Kontrolle). Membranständige Proteine wurden 8 Stunden (a) und 28 Stunden (c) nach der zweiten Transfektion präpariert. Zusätzlich wurden die Westernblots über Phospho-Image Analyse semiquantitativ ausgewertet (b, d).

Um diese Spezifität auch in den hier verwendeten Zellsystemen zu untersuchen, wurden siRNA-Duplexe synthetisiert, die sich nur in einer Base von der HRAS-V12 spezifischen siRNA unterscheiden (Abbildung 4). Die Applikation der HRAS-Wildtyp-entsprechenden siRNA resultiert 8 Stunden nach der zweiten Transfektion in den NIH3T3-pEJ Zellen und in den EJ Zellen in einer Reduktion der Ras Expression von 70% bzw. 60% (Abbildung 6a,b;Abbildung 8a,b). Im Gegen-

satz dazu zeigte die Transfektion von HRAS-Wildtyp spezifischen siRNAs in FE-8 eine geringere Effizienz. Die Ras Expression wurde um ca. 40% reduziert (Abbildung 7).

Die beiden siRNA Duplexe HRAS-2M und HRAS-2MS haben dagegen keinen Effekt auf die Ras Expression (Abbildung 9). Die Einführung einer zweiten Mutation führt also zu einer Aufhebung des inhibitorischen Effekts der HRAS-Wildtyp spezifischen siRNA unabhängig von der Lokalisation des zweiten Basenaustausches (Abbildung 9).

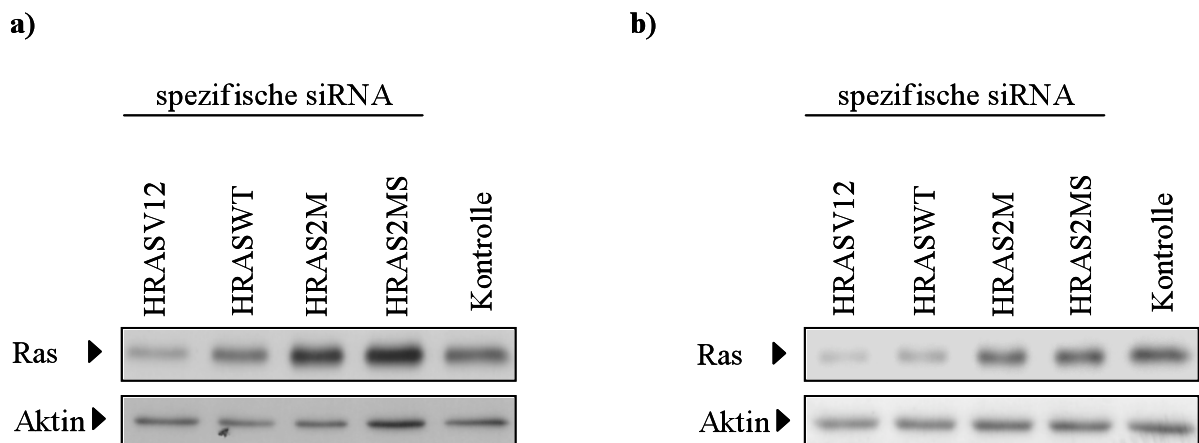


Abbildung 9: Westernblot Analyse der Ras Expression 4 Stunden (a) und 24 Stunden (b) nach der zweiten siRNA Transfektion. NIH3T3-pEJ Zellen wurden zweimal im Abstand von 24 Stunden mit siRNA Duplexen spezifisch gegen HRAS-V12, HRAS-WT oder mit einem der beiden Duplexe HRAS-2M und HRAS-2MS transfiziert. Als Ladungskontrolle diente auch hier ein Aktin-spezifischer Antikörper.

3.1.3 Die siRNA vermittelte Inhibition von HRAS-V12 führt in den Zelllinien NIH3T3-pEJ, FE-8 und EJ zu einer starken Reduktion des Zellwachstums

Durch die Transfektion von HRAS-V12 spezifischen siRNA Duplexen wird das Wachstum der NIH3T3-pEJ und der EJ Zellen um fast 80% reduziert, das der FE-8 Zellen um 70% (Abbildung 10). Die beiden Kontrollduplexe spezifisch gegen KRAS-V12 und EGFP haben in den NIH3T3-pEJ Zellen keinen Einfluss auf die Zellzahl, während der KRAS-spezifische Duplex bei den EJ und den FE-8 Zellen zu einer Zellzahlreduktion von 10% führt (Abbildung 10).

Auch die Transfektion von HRAS-Wildtyp spezifischen siRNA Duplexen führt in den NIH3T3-pEJ Zellen zu einer 50%igen Zellzahlreduktion und bei den EJ Zellen ist die Zellzahl sogar um 60-70% vermindert (Abbildung 10). Im Gegensatz dazu zeigt die Transfektion dieses Duplexes in FE-8 Zellen nur einen sehr geringen Einfluss auf die Zellzahl. Wie auch bei den beiden Kontroll-

duplexen wird hier die Zellzahl um ca. 10% reduziert. Der HRAS-Wildtyp spezifische siRNA Duplex zeigt in den FE-8 Zellen sowohl in Bezug auf die Ras Expression als auch auf die Proliferation einen sehr viel geringeren Einfluss als der HRAS-V12 spezifische Duplex.

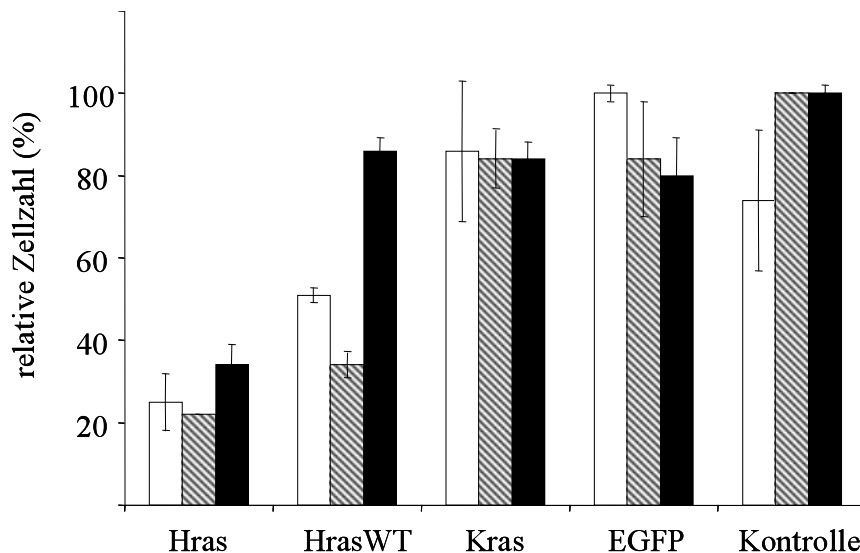


Abbildung 10: Graphische Darstellung der Zellzahl in NIH3T3-pEJ (□), EJ (▨) und FE-8 (■) Zellen nach Transfektion von siRNA Duplexen spezifisch für HRAS-V12, HRASWT, KRAS und EGFP. Die Zellen wurden zweimal im Abstand von 24 Stunden transfiziert und 52 Stunden nach der zweiten Transfektion die Zellzahl bestimmt. Die Probe mit der größten Zellzahl wurde jeweils als 100% genommen und die anderen Proben darauf bezogen.

Die RNA Interferenz Technologie konnte also in allen drei verwendeten Zelllinien erfolgreich etabliert werden und führt wie in den vorher beschriebenen Arbeiten zu einer starken Reduktion der Zellzahl. Um die biologische Ursache für diesen starken Einfluss der Ras Inhibition auf die Zellzahl zu untersuchen, wurde zunächst eine Zellzyklusanalyse durchgeführt.

3.1.4 Die Inhibition des HRAS-V12 Proteins resultiert in einer erhöhten Anzahl von Zellen in der G1-Phase des Zellzyklus

Wie beschrieben bewirkt die Transfektion von HRAS-V12- und von HRAS-Wildtyp- spezifischen siRNA Duplexen eine starke Reduktion der Zellzahl. Um herauszufinden, ob diese Verringerung der Zellzahl durch die Induktion von Apoptose oder durch einen Wachstumsstopp hervorgerufen

wird, wurde eine Durchfluss Zytometrie durchgeführt. Dazu wurden die fixierten Zellen mit Propidiumiodid inkubiert, einem Molekül, das in die DNA interkaliert. Das Propidiumiodid wird mittels eines Lasers angeregt und fluoresziert. Die Fluoreszenz einer Zelle ist proportional zu ihrem DNA-Gehalt. Da sich der DNA-Gehalt der Zellkerne während des Zellzyklus in charakteristischer Weise verändert, ist eine Zuordnung der Zellen zu einer bestimmten Zellzyklusphase möglich.

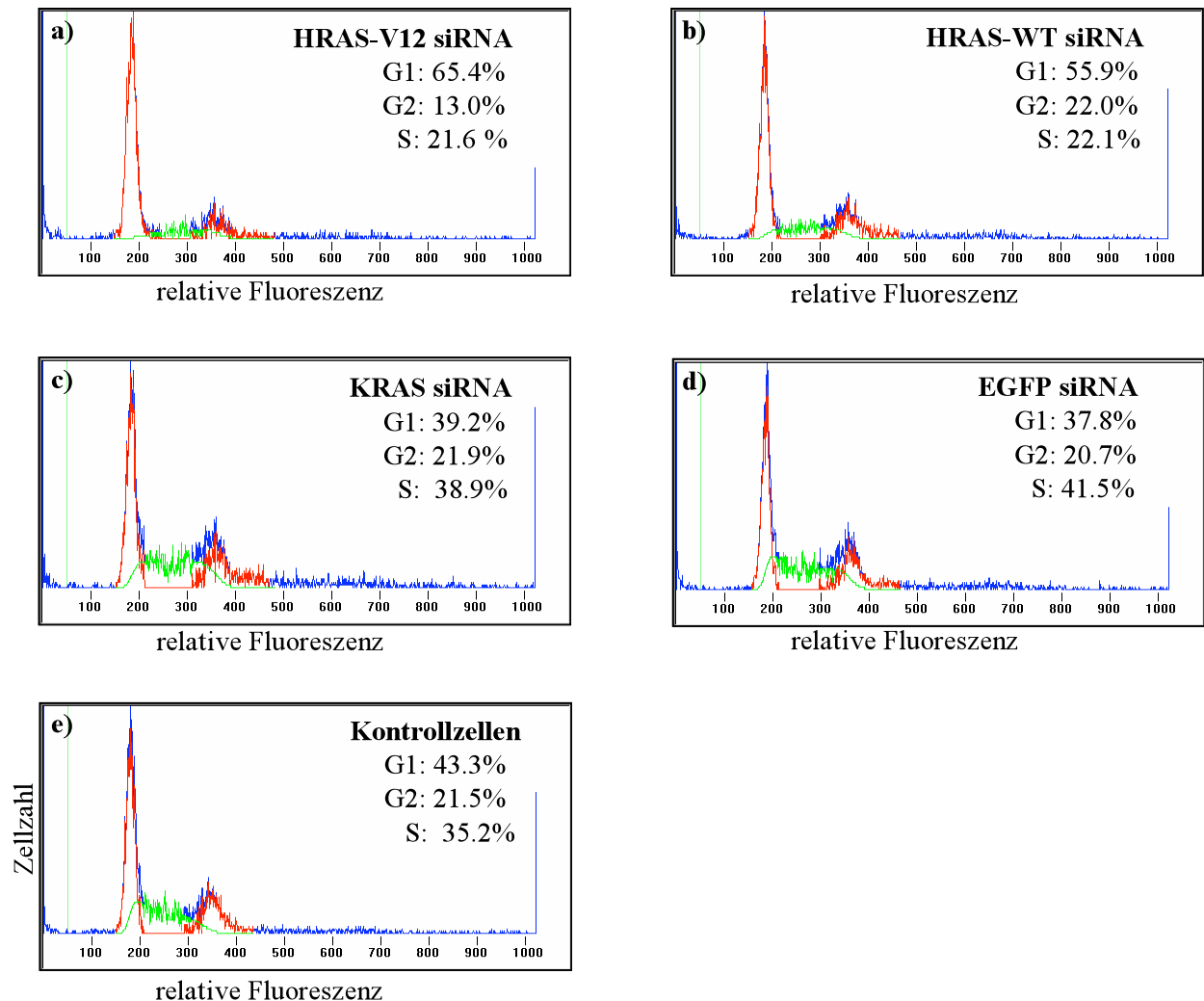


Abbildung 11: DNA-Gehalt von NIH3T3-pEJ Zellen 28 Stunden nach Transfektion mit HRAS-V12 (a), HRAS-WT (b), KRAS (c) oder EGFP (d) spezifischen siRNA Duplexen. Als Kontrolle dienten mit Oligofectamin transfizierte Zellen (e). Neben der graphischen Darstellung wurde die prozentuale Verteilung der Zellen in G1, G2 und S Phase aufgeführt.

In den Kontrollzellen befinden sich 43,3% der Zellen in der G1-Phase, 21,5% in der G2-Phase und 35,2% in der S-Phase (Abbildung 11e). Ähnlich sieht die Verteilung der Zellen in den verschiedenen Zellzyklusphasen aus, wenn die Zellen mit KRAS- oder EGFP-spezifischen Duplexen

behandelt wurden (Abbildung 11c,d). Im Gegensatz dazu führt die Transfektion HRAS-V12 spezifischer siRNAs innerhalb von 28 Stunden zu einer Erhöhung der Zellen, die sich in der G1-Phase befinden um 22%. Der Anteil der Zellen, die sich in der G2 bzw. der S Phase befinden ist dagegen gegenüber den Kontrollen um 8,5 bzw. 13,6% reduziert. Ähnlich verhält es sich bei den Zellen, die mit HRAS-Wildtyp spezifischer siRNA behandelt wurde. Passend zu den schon beschriebenen Daten über den Einfluss dieser siRNA auf die Ras Expression und auf die Proliferation, konnte auch hier ein signifikanter Effekt auf die Verteilung der Zellen in den verschiedenen Zellzyklusstadien nachgewiesen werden (Abbildung 11). So wurde der Anteil von Zellen in der G1 Phase um 12,6% erhöht und der Zellen in S Phase um den gleichen Wert minimiert. Im Gegensatz zu der HRAS-V12 spezifischen siRNA zeigte die HRAS-Wildtyp spezifische siRNA allerdings keinen Einfluss auf den Anteil der Zellen in der G2 Phase.

Die Erhöhung des Anteiles von Zellen in der G1 Phase und das Fehlen einer Population mit einem DNA Gehalt unterhalb von G1 impliziert, dass die Inhibition der Ras Expression keine Apoptose induziert, sondern zu einem Zell Zyklus Arrest führt.

3.1.5 Einfluss der HRAS-V12 Inhibition auf die Zellmorphologie

Die Transfektion von Nagerzellen mit einem konstitutiv aktiven HRAS-V12 Onkogen bewirkt eine morphologische Transformation der Zellen. Die Zellen besitzen ein spindelförmiges Aussehen (Abbildung 12d). Im Gegensatz dazu weisen normale Fibroblasten eine abgeflachte Morphologie auf (Abbildung 12e).

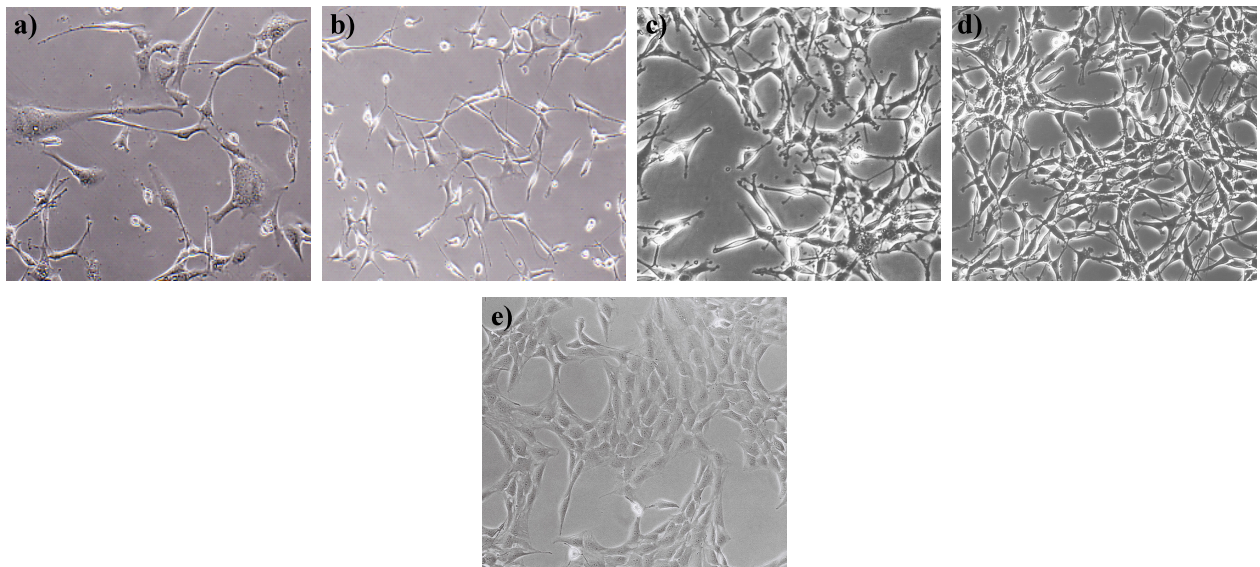


Abbildung 12: Morphologie der NIH3T3-pEJ Zellen 48 Stunden nach der zweiten Transfektion mit siRNA-Duplexen spezifisch für HRAS-V12 (a), HRAS-WT (b), KRAS (c) und von mit Oligofectamin transfizierten Zellen (d). Zum Vergleich wurde auch ein Bild der immortalen NIH3T3 Zellen (e) hinzugefügt.

Im Falle der Mausfibroblasten-Zelllinie NIH3T3-pEJ führte der Knockdown des HRAS-V12 Proteins zu einer leichten Abflachung der Zellen (Abbildung 12a). Vergleicht man die Morphologie der transfizierten Zellen allerdings mit der Morphologie der immortalen NIH3T3 Zellen (Abbildung 12e), so fällt auf, dass die Inhibition des HRAS-V12 Proteins zu keiner vollständigen Reversion führt. Die Transfektion des HRAS-Wildtyp- (Abbildung 12b) und des KRAS- (Abbildung 12c) spezifischen Duplexes hat keine Auswirkungen auf die Zellmorphologie.

Bei den FE-8 und den EJ Zellen hat die Ausschaltung des HRAS-V12 Onkogens dagegen keine Auswirkungen auf die Morphologie der Zellen (Daten nicht gezeigt). Hier scheint die Inhibition der Ras Expression für die morphologische Reversion der Zellen nicht auszureichen. Da die Inhibition der Ras Expression nur in den NIH3T3-pEJ einen Einfluss auf die Morphologie hat, wurde diese Zelllinie in den weiteren Experimenten verwendet.

3.1.6 Das HRAS-V12 Onkogen ist für das verankerungsunabhängige Wachstum in NIH3T3-pEJ notwendig

Transformierte Zellen zeichnen sich unter anderem durch die Fähigkeit des verankerungsunabhängigen Wachstums aus. Sie benötigen zur Proliferation also keine extrazelluläre Matrix, auf der sie sich festsetzen können. Die in Kapitel 3.1.5 beschriebene Abflachung der Zellen nach Inhibition der Ras Expression legt die Vermutung nahe, dass die Zellen die Fähigkeit zum verankerungsunabhängigen Wachstum eingebüßt haben. Um diese Hypothese zu testen, wurde das verankerungsunabhängige Wachstum nach siRNA vermittelter Hemmung von HRAS- V12 analysiert.

24 Stunden nach der zweiten Transfektion wurden die Zellen auf Poly-HEMA- beschichtete 96well Platten ausgesät. Poly-HEMA ist ein Polymer, das die Anheftung der Zellen an die Oberfläche der Zellkulturplatte verhindert. Somit können sich nur noch die Zellen teilen, die zu einem verankerungsunabhängigen Wachstum fähig sind.

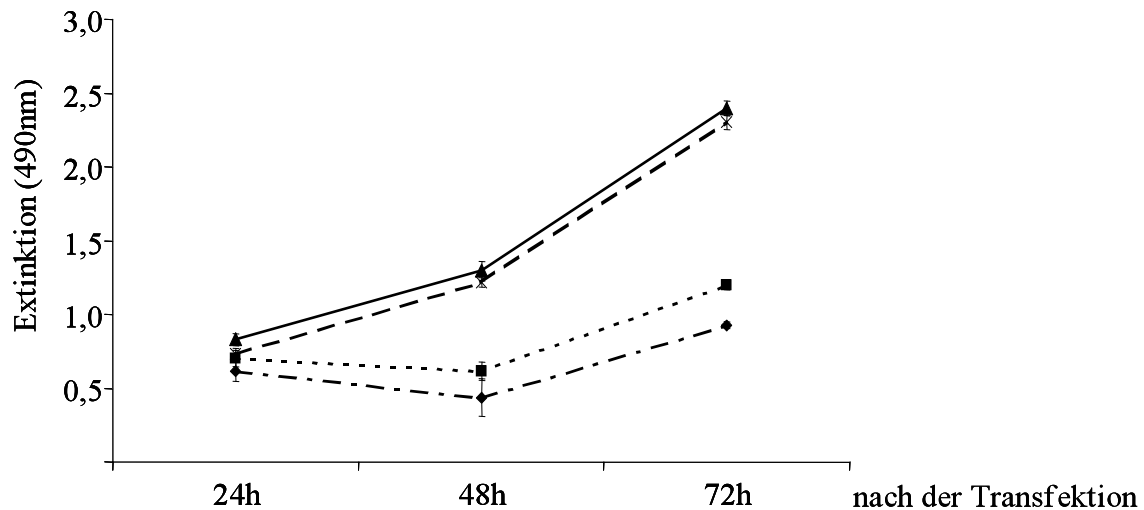


Abbildung 13: Bestimmung des verankerungsunabhängigen Wachstums in NIH3T3-pEJ Zellen mittels eines XTT-Assays. Die Zellen wurden zweimal im Abstand von 24 Stunden mit siRNAs spezifisch gegen HRAS-V12 (Raute), HRAS-WT (Rechteck), KRAS (Kreuz) und Kontrolltransfiziert (Dreieck) und dann auf PolyHEMA-beschichtete Platten ausgesät. Die Anzahl der metabolisch aktiven Zellen wurde 24 Stunden, 48 Stunden und 72 Stunden nach dem Umsetzen der Zellen mittels eines XTT-Assays bestimmt.

Die Inhibition des HRAS-V12 Onkogens mittels spezifischer siRNA Duplexe bewirkt eine starke Reduktion des verankerungsunabhängigen Wachstums (Abbildung 13) im Vergleich zu den NIH3T3-pEJ Kontrollen. Während das Wachstum 24-48 Stunden nach der Aussaat vollständig inhibiert ist, nehmen die Zellen 2 Tage nach der Umsetzung auf die beschichteten 96well-Platten die Zellteilung wieder auf, wachsen allerdings langsamer als die Kontrollen (Abbildung 13). Auch die Transfektion von HRAS-Wildtyp spezifischen siRNAs führt in NIH3T3-pEJ Zellen zu einer vergleichbar starken Reduktion im verankerungsunabhängigen Wachstum, während der KRAS-spezifische Duplex keine Auswirkungen auf das Wachstum hat.

3.1.7 Die Inhibition des HRAS-V12 Proteins hat nur geringe Auswirkungen auf nachgeschaltete Signalwege

Die Ras Proteine aktivieren eine Vielzahl von unterschiedlichen Signaltransduktionswegen (zusammengefasst in {Repasky, 2004 #302}; Abbildung 14). Dabei zählen die Raf, die PI3K und die RalGDS-Kaskade zu den am besten charakterisierten Signalwegen. Daneben können die Ras Proteine aber auch mit dem negativen Wachstumsregulator IMP oder mit den Guaninnukleotid austauschfaktoren (GEFs) Tiam1, PLC ϵ und Rin interagieren (Abbildung 14).

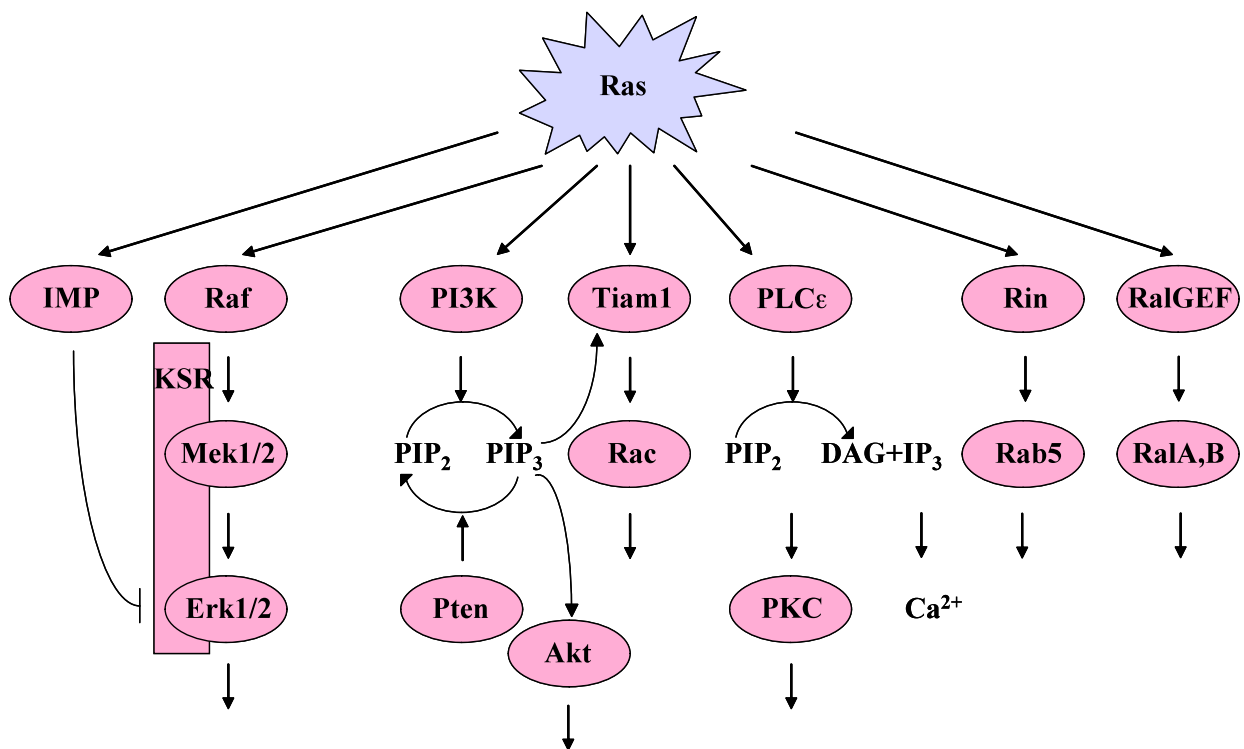


Abbildung 14: Übersicht über die zytoplasmatischen Signaltransduktionswege, die in der Ras-vermittelten Transformation eine Rolle spielen. Dabei existieren neben den drei gut charakterisierten Effektoren Raf, PI3K und RalGEF unter anderem auch der negative Wachstumsregulator IMP und das Tumorsuppressorprotein Pten. Zahlreiche Ras Effektoren wie z.B. Rin, Tiam1, PLCε und RalGEF fungieren als Guaninnukleotidaustauschfaktoren (GEFs) für andere Mitglieder der Ras Protein Superfamilie (Abb. aus {Repasky, 2004 #302}).

Die Verwendung von Ras-Effektorloopmutanten zeigte, dass die Aktivierung des Raf-Mek-Erk Signaltransduktionsweges in Nagerzellen für das verankerungsunabhängige Wachstum ausreicht {Webb, 1998 #266} {Hamad, 2002 #84}. Allerdings ist die Anzahl der Kolonien die durch die Raf Aktivierung entstanden geringer als bei den Ras-transformierten Zellen. Neben den Raf Proteinen scheinen also noch zusätzliche Ras-Effektoren für die Transformation von Nagerzellen von Bedeutung zu sein.

Mittels Westernblot Analyse wurde die Aktivierung verschiedener RAS Effektoren nach siRNA-vermittelter Inhibition des HRAS-V12 Onkogens analysiert (Abbildung 15;Abbildung 16).

Die Applikation von HRAS-V12-spezifischen siRNA Duplexen hat 24 Stunden nach der zweiten Transfektion nur einen sehr geringen Einfluss auf die Phosphorylierung von Erk1 und Erk2 (Abbildung 15). Diese leichte Hemmung der Erk1/Erk2 Aktivierung ist zu früheren (4 Stunden)

und zu späteren Zeitpunkten (48 und 72 Stunden) nicht zu erkennen. Die erfolgreiche Inhibition der Ras Expression wurde anhand der charakteristischen Zell-Morphologie kontrolliert (Abbildung 12).

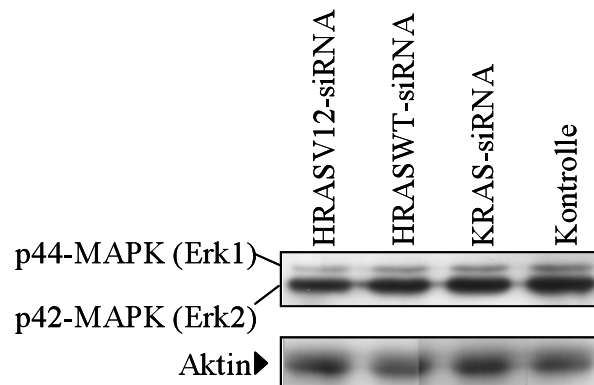


Abbildung 15: Nachweis der Aktivierung von Erk1 und Erk2 mittels Western Blot Analyse. NIH3T3-pEJ Zellen wurden mit siRNAs spezifisch für HRAS-V12, HRAS-WT und KRAS transfiziert und Gesamtextrakte 24 Stunden nach der zweiten Transfektion präpariert. Als Ladungskontrolle diente ein Aktin-spezifischer Antikörper.

Da für den Ras-Effektor RalGDS kein funktionierender Antikörper gefunden werden konnte, wurde die Expression von RalA analysiert. RalGDS fungiert als Austauschfaktor für RalA und RalB. Die Inhibition der HRAS-V12 Expression bedingt hier 4 Stunden nach der zweiten Transfektion eine Erhöhung der RalA Expression gegenüber der Kontrolle (Abbildung 16). Jedoch zeigen die Kontrollzellen zu diesem Zeitpunkt eine stark verminderte Expression von RalA gegenüber den anderen Zeitpunkten. Zu den beiden späteren Zeitpunkten konnte kein Unterschied zwischen den mit HRASV12-siRNA transfizierten und den Kontrollzellen festgestellt werden.

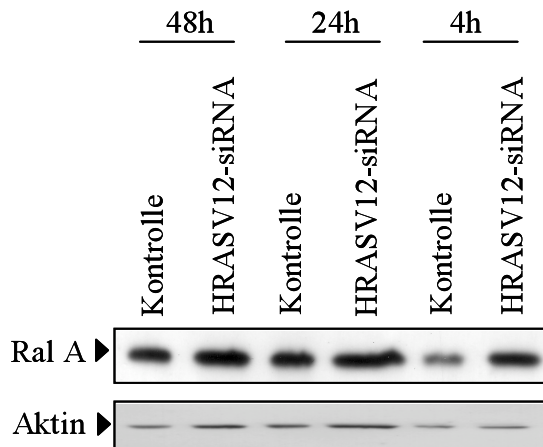
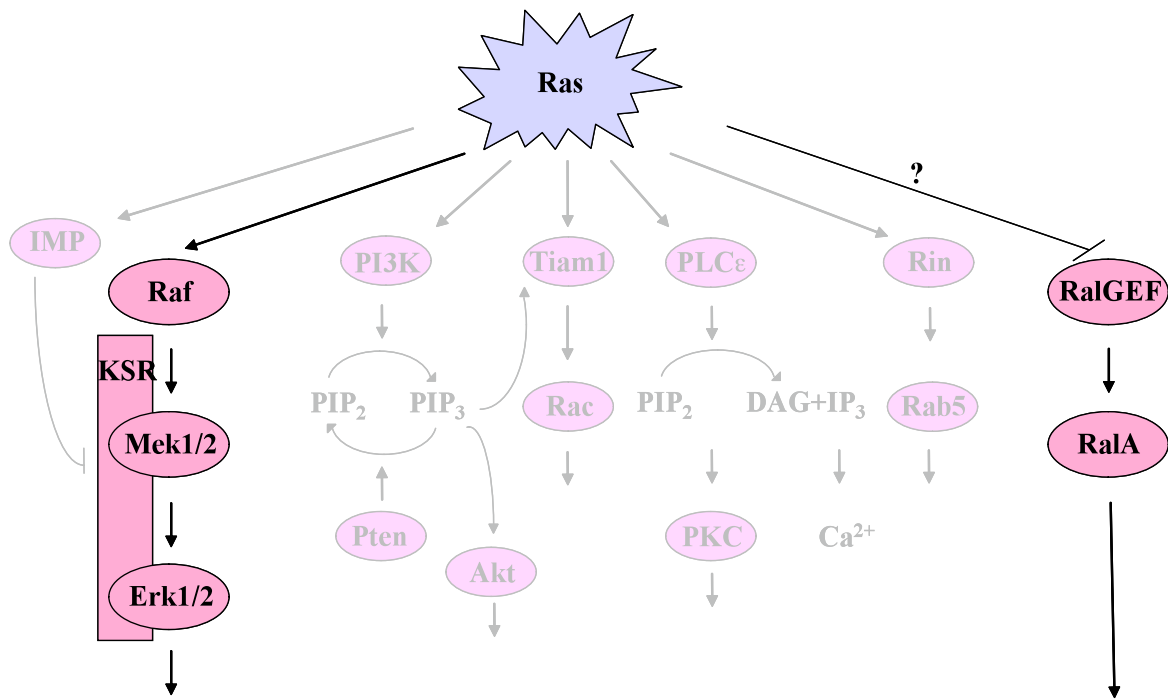


Abbildung 16: Einfluss der Applikation von HRASV12-spezifischen siRNA Duplexen auf die Expression von Ral A in NIH3T3-pEJ Zellen mittels Westernblot Analyse. Die Zellen wurden zweimal in einem Abstand von 24 Stunden mit siRNA Duplexen spezifisch gegen HRASV12 transfiziert. Als Kontrolle dienten mit Oligofectamine transfizierte NIH3T3-pEJ Zellen. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Gesamtproteine isoliert. Als Ladungskontrolle diente ein Aktin spezifischer Antikörper.

Um genauere Aufschlüsse der Ras Inhibition auf den RalGDS Signaltransduktionsweg zu erlangen, müsste allerdings die Aktivierung von RalGDS oder RalA untersucht werden.

Die Inhibition bestimmter Zielgene mittels RNA Interferenz konnte in den NIH3T3-pEJ, den FE-8 und den EJ Zellen erfolgreich etabliert werden. Wie in vorherigen Arbeiten gezeigt, führt die Inhibition der Ras Expression in transformierten Zellen zu einer Hemmung der Proliferation. Mittels Durchfluss Zytometrie konnte gezeigt werden, dass es sich dabei um einen Wachstumsstopp in der G1-Phase des Zellzyklus handelt. Desweiteren bewirkt die Hemmung der Ras Expression in den NIH3T3-pEJ Zellen eine Abflachung der Zellen und damit einhergehend eine Inhibition des verankerungsunabhängigen Wachstums. Interessanterweise zeigt die Transfektion von HRASV12-spezifischen siRNA Duplexen nur einen geringen Einfluss auf die Aktivierung von Erk1/2 und auf die Expression von RalA.



Morphologie, Proliferation, Kontrolle G1 Phase

Abbildung 17: Zusammenfassende Darstellung der mittels HRAS-V12-spezifischen siRNA Duplexen erhaltenen Ergebnisse.

3.2 A-RAF, B-RAF und c-Raf-1 üben isoform-spezifische Funktionen in der Kontrolle des Zellwachstums und in der Weiterleitung des Ras Signals aus

3.2.1 Raf-Isoform spezifische RNA Interferenz

Sowohl durch die Verwendung der in Kapitel 1.2 beschriebenen Effektorloopmutanten als auch durch die Applikation von Kinase-Inhibitoren konnte gezeigt werden, dass der Raf-Mek-Erk Signaltransduktionsweg in der Transformation von Nagerzellen eine wichtige Rolle spielt {Webb, 1998 #266} {Hamad, 2002 #84}. In den NIH3T3-pEJ Zellen wurde die Transformation durch die gezielte Überexpression des HRAS Onkogens induziert. Das HRAS Onkoprotein kann 3 Raf Isoformen aktivieren, A-Raf, B-Raf und c-Raf-1. Es wird angenommen, dass alle Raf Isoformen in diesen Zellen exprimiert werden. Die Methode der RNA Interferenz bietet die Möglichkeit, die Rolle dieser drei Kinasen in der Transformation und Proliferation der NIH3T3-pEJ Zellen getrennt voneinander zu untersuchen.

SiRNA Duplexe spezifisch für A-Raf, B-Raf oder c-Raf-1 wurden in NIH3T3-pEJ Zellen transfiziert und die Inhibition der jeweiligen Raf-Isoform mittels RT-PCR nachgewiesen (Abbildung 18). Dabei konnte festgestellt werden, dass sich diese Inhibition unterschiedlich auf die mRNA Mengen der einzelnen Isoformen auswirkt. Die Applikation A-Raf spezifischer siRNA Duplexe führte 28 Stunden nach der zweiten Transfektion zu einer leichten Verringerung der A-Raf mRNA (Abbildung 18a). Zum 52 Stunden bzw. 78 Stunden Zeitpunkt ist dann nur noch ein sehr schwaches Signal zu erkennen (Abbildung 18b, c).

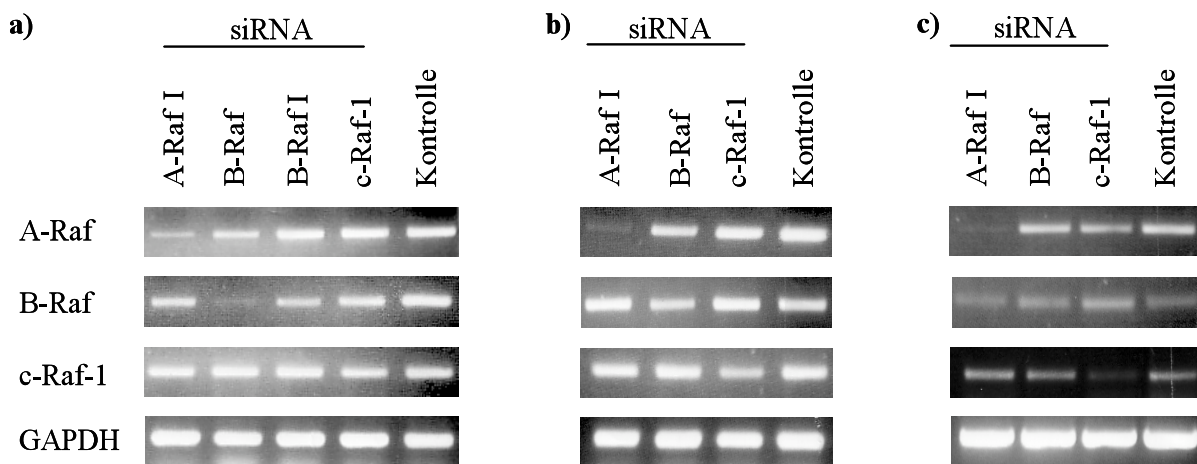


Abbildung 18: RT-PCR Analyse der A-Raf, B-Raf und c-Raf-1 mRNAs nach isoform-spezifischer siRNA Transfektion in NIH3T3-pEJ Zellen. RNA wurde 28 Stunden (a), 52 Stunden (b) und 78 Stunden (c) nach der zweiten Transfektion präpariert. Durch isoformspezifische Primer wurde die mRNA Expression von A-Raf, B-Raf und c-Raf-1 nachgewiesen. Die GAPDH Expression zeigt, dass in allen Proben vergleichbare Mengen RNA vorhanden sind.

Die Degradation der B-Raf mRNA ist dagegen von kürzerer Dauer. 28 Stunden nach der zweiten Transfektion konnte eine starke Inhibition der B-Raf mRNA beobachtet werden (Abbildung 18a), allerdings ist schon 24 Stunden später der Knockdown fast wieder vollständig aufgehoben (Abbildung 18b). 78 Stunden nach der zweiten Transfektion konnte keine Verminderung der B-Raf mRNA festgestellt werden (Abbildung 18c).

Die Inhibition der c-Raf-1 mRNA nahm über die drei Zeitpunkte stetig zu und erreichte ihr Maximum 78 Stunden nach der zweiten Transfektion (Abbildung 18c). Alle drei siRNA Duplexe führen also zu einer starken Reduktion der mRNA der entsprechenden Raf- Isoform allerdings zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Transfektion.

Zusätzlich zu dem Nachweis auf RNA Ebene wurde c-Raf-1 auch auf der Proteinebene nachgewiesen (Abbildung 19). Dabei konnte gezeigt werden, dass die Kinetik der Inhibition des c-Raf-1 Proteins dem der mRNA entspricht. Auch hier ist 52 Stunden nach der zweiten Transfektion nur noch eine leichte Bande zu erkennen, während 78 Stunden nach der zweiten Transfektion kein c-Raf-1 Protein mehr nachweisbar ist (Abbildung 19).

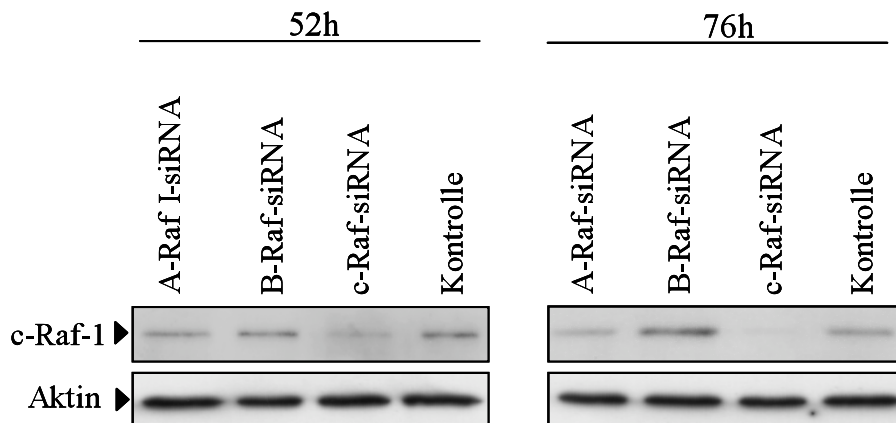


Abbildung 19: Western Blot Analyse der c-Raf-1 Expression von NIH3T3-pEJ Zellen transfiziert mit siRNA Duplexen spezifisch gegen A-Raf, B-Raf und c-Raf-1. Gesamtproteinextrakte wurden 52 und 76 Stunden nach der zweiten Transfektion präpariert. Als Ladungskontrolle diente ein aktinspezifischer Antikörper.

Für die zeitlichen Unterschiede in der mRNA Degradation zwischen den einzelnen Raf-Isoformen gibt es zwei mögliche Erklärungen. Die Menge an mRNA kann sich zwischen den drei Raf-Isoformen unterscheiden. So könnten möglicherweise wesentlich mehr Kopien der c-Raf-1 spezifischen mRNA vorliegen im Vergleich zu A-Raf und B-Raf. Aber auch die Geschwindigkeit der Transkription könnte sich zwischen den drei Isoformen unterscheiden. Die Inhibition der B-Raf Expression zeigt die kürzeste Dauer. Möglicherweise wird diese mRNA im Vergleich zu der A-Raf und der c-Raf-1 spezifischen mRNA am schnellsten synthetisiert, so dass die Degradation rasch wieder aufgehoben wird.

3.2.2 Die Raf-Isoformen spielen unterschiedliche Rollen in der Kontrolle des Zellwachstums

Um den Effekt der einzelnen Raf-Isoformen auf das Zellwachstum zu bestimmen, wurden NIH3T3-pEJ Zellen mit Raf-isoformspezifischen siRNA Duplexen behandelt und die Zellen 48 Stunden nach der zweiten Transfektion ausgezählt. In Abbildung 20 ist die relative Zellzahl der mit siRNA-Duplexen behandelten Proben im Vergleich zu der Kontrolle dargestellt.

Die Inhibition der A-Raf Isoform resultiert in einer starken Reduktion der Zellzahl auf 20% der Kontrollzellen (Abbildung 20). Auch die c-Raf-1 spezifische siRNA führt zu einer 60-70% igen Reduktion der Zellzahl. Dagegen hat die Inhibition der B-Raf mRNA nur einen geringen Einfluss auf die Zellzahl. Hier wurde die Zellzahl um 30% reduziert (Abbildung 20). Allerdings ist zu beachten, dass zu dem für dieses Experiment gewählten Zeitpunkt nur noch eine sehr geringe Inhibition der B-Raf mRNA vorlag. Eventuell sollten die Bedingungen in diesem Experiment so gewählt werden, dass eine deutlichere und längere Inhibition der B-Raf mRNA erreicht wird.

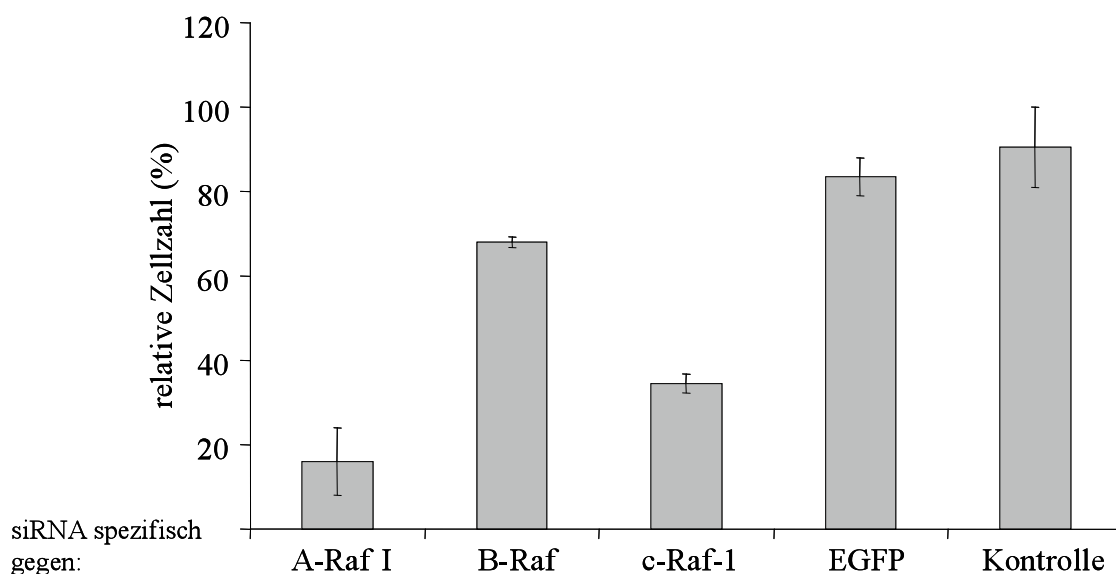


Abbildung 20: Graphische Darstellung der relativen Zellzahlen in NIH3T3-pEJ Zellen nach Transfektion von siRNA Duplexen spezifisch für A-Raf, B-Raf, c-Raf-1 oder EGFP. Die Zellen wurden 48 Stunden nach der zweiten Transfektion ausgezählt und der höchste Wert gleich 100% gesetzt. Die anderen Proben wurden dazu in Relation gesetzt.

Betrachtet man das Zellwachstum über einen längeren Zeitraum (Abbildung 21), so zeigt auch hier die Transfektion der A-Raf spezifischen siRNA den stärksten Effekt auf die Proliferation.

Doch auch die Inhibition von B-Raf oder c-Raf-1 führt zu einer Reduktion des Zellwachstums im Vergleich zu den nur mit dem Transfektionsreagenz behandelten Zellen (Abbildung 21).

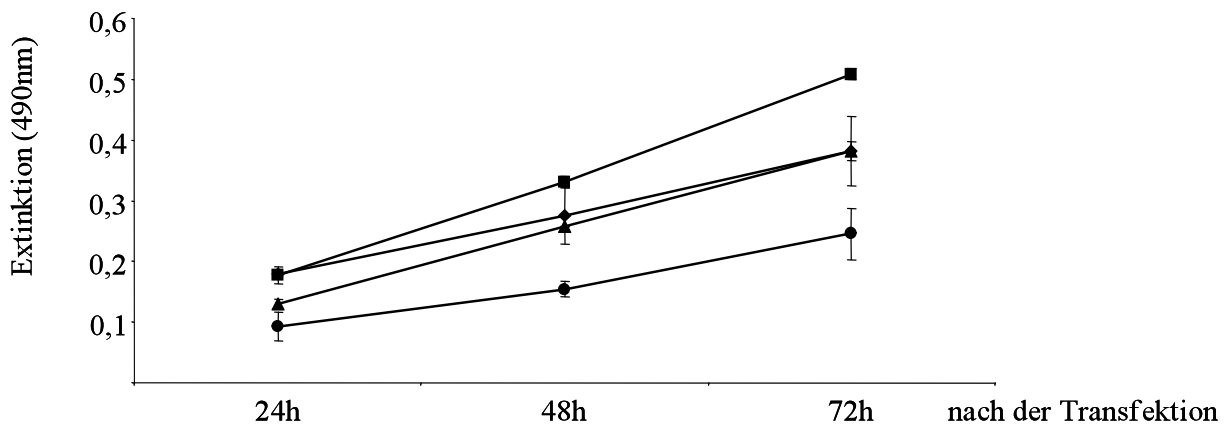


Abbildung 21: Wachstumskurven der NIH3T3-pEJ Zellen nach Transfektion mit siRNA Duplexen spezifisch gegen A-Raf (Kreis), B-Raf (Raute) oder c-Raf-1 (Dreieck) oder mit Oligofectamin transfizierte NIH3T3-pEJ (Rechteck). Die Zellen wurden 24 Stunden nach der zweiten Transfektion ausplattiert und die Zellproliferation mittels eines XTT-Assays 48, 72 und 96 Stunden nach der 2. Transfektion gemessen.

3.2.3 Die Inhibition der A-Raf oder der c-Raf-1 Expression resultiert in einem Verlust des verankerungsunabhängigen Wachstums von NIH3T3-pEJ Zellen

Im Vergleich zum Wachstum auf Plastik wird das verankerungsunabhängige Wachstum noch stärker durch alle drei Raf-Isoformen beeinflusst (Abbildung 22). So führt die Inhibition jeder einzelnen Raf-Isoform zu einer vollständigen Hemmung des Wachstums 72 Stunden nach der Transfektion. Die mit B-Raf spezifischen siRNAs transfizierten Zellen zeigen nach weiteren 24 Stunden wieder einen leichten Anstieg der Proliferation, während die Wachstumskurven für die mit A-Raf bzw. c-Raf-1 siRNA behandelten Zellen kaum ansteigen (Abbildung 22). A-Raf und c-Raf-1 haben also einen stärkeren Einfluss auf das verankerungsunabhängige Wachstum als B-Raf, jedoch muss auch hier beachtet werden, dass die B-Raf Isoform zu diesem Zeitpunkt auf mRNA Ebene keine verminderte Expression mehr aufweist (Abbildung 18). Zwischen dem Einfluss der A-Raf und der c-Raf-1 Isoform auf die Proliferation konnte kein Unterschied festgestellt werden (Abbildung 22).

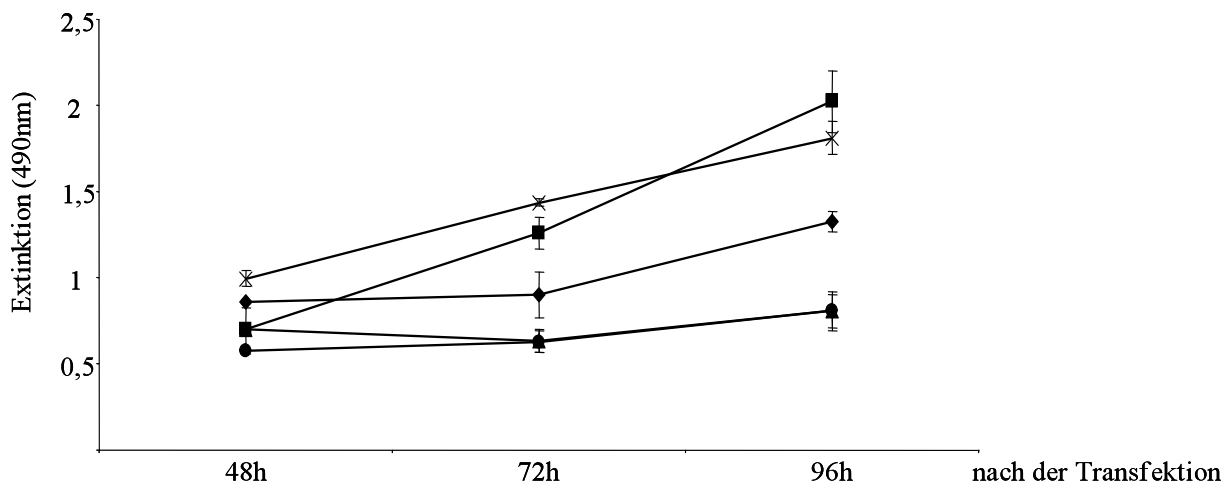


Abbildung 22: Verankerungsunabhängiges Wachstum von NIH3T3-pEJ Zellen transfiziert mit siRNA Duplexen spezifisch gegen A-Raf (Kreis), B-Raf (Raute), c-Raf-1 (Dreieck) oder EGFP (Kreuz) oder Kontrolltransfizierte Zellen (Rechteck). Das Wachstum wurde 48 Stunden, 72 Stunden und 96 Stunden nach der zweiten Transfektion mittels eines XTT-Assays bestimmt.

3.2.4 Die Raf-Isoformen haben unterschiedliche Effekte auf die Morphologie von NIH3T3-pEJ Zellen

Wie in Kapitel 3.2.2 beschrieben, hat die Inhibition der A-Raf Expression den stärksten Einfluss auf die Zellzahl (Abbildung 20). Weiterhin wurde auch ein deutlicher Effekt auf die Morphologie beobachtet (Abbildung 23). Die Applikation von A-Raf spezifischen siRNAs führt zu einer vermehrten Abrundung der NIH3T3-pEJ Zellen (Abbildung 23a). Im Gegensatz dazu hat die Inhibition der B-Raf Isoform keinen signifikanten Effekt auf die Morphologie der Zellen (Abbildung 23b). Sie weisen immer noch den transformierten Phänotyp auf. Auch die Transfektion der c-Raf-1 spezifischen siRNA Duplexe führt nicht zu einer Abflachung der Zellen (Abbildung 23c). Allerdings ist die Zellkultur mit stark vergrößerten Zellen durchsetzt (siehe Pfeile). Die Inhibition jeder einzelnen Raf-Isoform für sich, reicht offenbar nicht aus, um eine Reversion des transformierten Phänotyps in den NIH3T3-pEJ Zellen hervorzurufen.

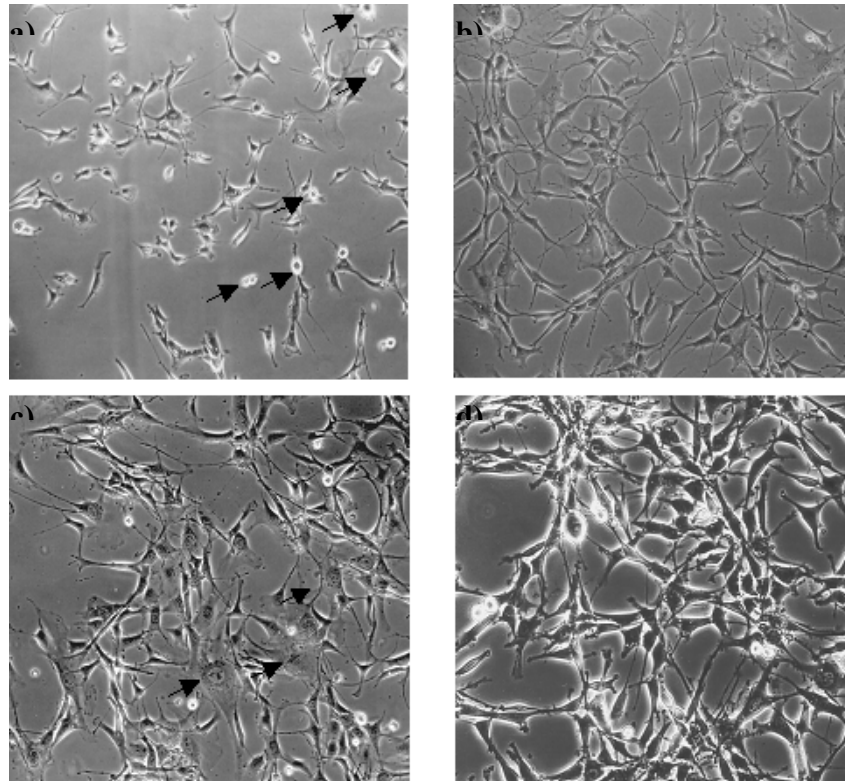


Abbildung 23: Morphologie der NIH3T3-pEJ Zellen 48 Stunden nach der zweiten Transfektion mit siRNA Duplexen spezifisch gegen A-Raf (a), B-Raf (b) oder c-Raf-1 (c) oder Kontrolltransfiziert (d).

3.2.5 C-Raf-1 hat eine wichtige Funktion in der Aktivierung der Substratkinasen Mek1/2

Für die Raf-Kinasen konnte eine Vielzahl von unterschiedlichen Substraten und Interaktionspartnern charakterisiert werden {Hindley, 2002 #90}. Eine Aktivierung der beiden Kinasen Mek1 und Mek2 wurde für alle drei Raf-Isoformen beschrieben {Reuter, 1995 #194} {Wu, 1996 #274}. Interessanterweise hat die Ausschaltung jeder einzelnen Raf Isoform in Mäusen keine Auswirkungen auf die Weiterleitung des mitogenen Signals über Mek1/2 {Mikula, 2001 #160} {Huser, 2001 #97} {Wojnowski, 2000 #273} {Pritchard, 1996 #190}. Um nun zu überprüfen, in wieweit sich die Ausschaltung der drei unterschiedlichen Raf-Isoformen *in vitro* auf die Aktivierung ihrer Substratkinasen Mek1/2 auswirkt, wurden Western Blot Analysen mit einem phospho-Mek1/2 spezifischen Antikörper nach siRNA vermittelter Raf-Hemmung durchgeführt (Abb. 24).

Dabei zeigte sich, dass die Inhibition von A-Raf zu allen untersuchten Zeitpunkten keinen Effekt auf die Aktivierung der beiden Substratkinasen hat (Abbildung 24). Im Gegensatz dazu führt die Inhibition der B-Raf Isoform 52 Stunden nach der zweiten Transfektion zu einer leichten Reduk-

tion der phospho-Mek1/2 Menge (Abbildung 24). Der Knockdown von c-Raf-1 hingegen führt im gleichen Zeitraum zu einer starken Inhibition der Mek1/2 Aktivierung (Abbildung 24).

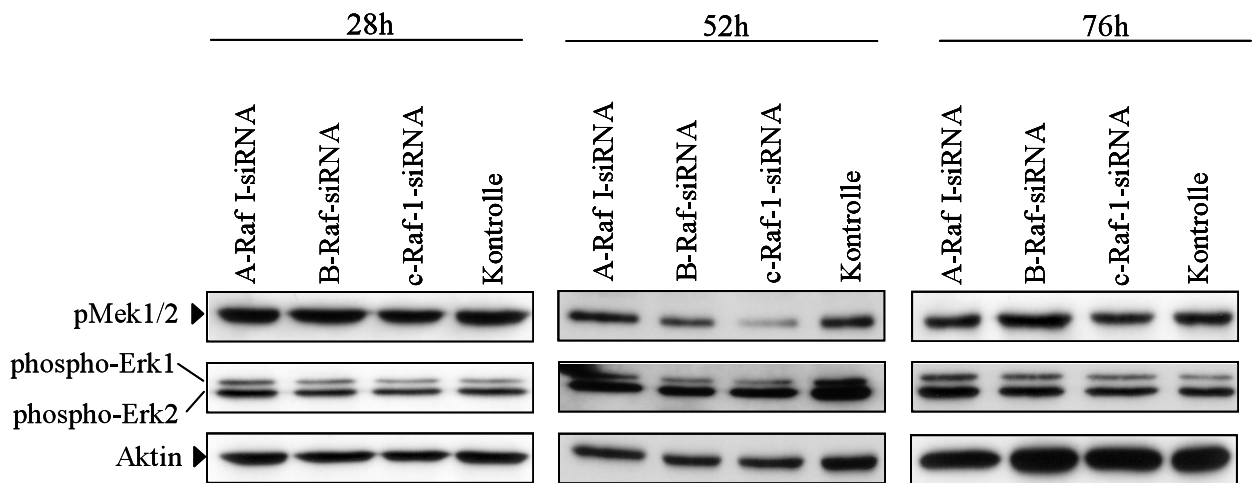


Abbildung 24: Western Blot Analyse der phospho-Mek1/2 und phospho-Erk1/2 Expression nach Transfektion der NIH3T3-pEJ Zellen mit siRNA Duplexen spezifisch gegen A-Raf, B-Raf oder c-Raf-1 sowie Kontrollzellen. Die Proteinextrakte wurden 28, 52 und 76 Stunden nach der zweiten Transfektion präpariert. Als Ladungskontrolle diente ein Aktin-spezifischer Antikörper.

Zusätzlich zu der Aktivierung von Mek1 und Mek2 wurde auch die Aktivierung der Mek1/2 Substratkinasen Erk1/2 bestimmt (Abbildung 24). Die Inhibition aller drei Raf-Isoformen hat 52 Stunden nach der zweiten Transfektion nur einen geringen Einfluss auf die Aktivierung von Erk1 und Erk2 (Abbildung 24).

3.2.6 NIH3T3-pEJ Zellen exprimieren spezifische Spleißvarianten von B-Raf

Wie in Kapitel 3.2.5 gezeigt werden konnte, hat die Inhibition der B-Raf-Isoform nur einen geringen Einfluss auf die Aktivierung ihrer Substratkinasen Mek1 und Mek2 (Abbildung 24). Dieses steht im Gegensatz zu bisher veröffentlichten Daten, in denen gezeigt werden konnte, dass B-Raf von allen drei Raf-Isoformen die größte Affinität zu Mek1 und Mek2 hat und diese im Vergleich zu A-Raf und c-Raf-1 am stärksten aktiviert {Reuter, 1995 #194}. Allerdings wurde im gleichen Jahr von einer anderen Arbeitsgruppe beschrieben, dass die B-Raf mRNA in vier verschiedenen, alternativ gespleißten Transkripten vorliegen kann {Barnier, 1995 #16} (Abbildung 25).

Die hieraus hervorgehenden B-Raf-Proteine unterscheiden sich in ihrer Kinase Aktivität und in ihrer onkogenen Potenz {Papin, 1998 #180}. So konnte gezeigt werden, dass die Anwesenheit des Exons 10 in der kodierenden mRNA die Affinität zwischen dem entsprechenden B-Raf-Protein und Mek1/2 erhöht. Auch die wachstumsfördernden und transformierenden Aktivitäten dieser Spleißisoform sind im Vergleich zu den anderen B-Raf Proteinen stärker {Papin, 1998 #180}. Die durch das Exon 8b kodierten Aminosäuren scheinen den gegenteiligen Effekt zu haben.

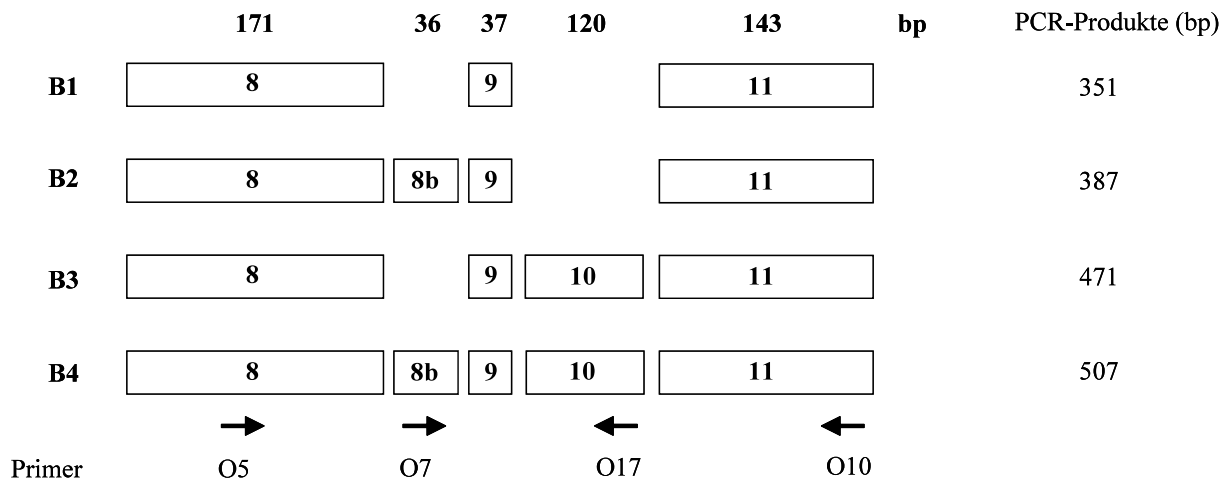


Abbildung 25: Schematische Darstellung der Exonstruktur der vier verschiedenen B-Raf-mRNAs. In der obersten Zeile sind die Größen der jeweiligen Exons in Basenpaaren angegeben. Die unterste Zeile gibt die Lokalisation der einzelnen Primer wieder. Auf der rechten Seite der Abbildung ist die Größe des jeweiligen PCR-Produkts bei Benutzung der Primer O5 und O10 aufgeführt.

Auf der mRNA Ebene unterscheiden sich die einzelnen alternativen Transkripte in der An- oder Abwesenheit der beiden Exons 8b und 10 (Abbildung 25). Die B-Raf mRNA B1 besitzt keines der beiden alternativen Exons, B2 besitzt Exon 8b, B3 besitzt Exon 10 und B4 besitzt beide Exons (Abbildung 25). Um nun zu untersuchen, welche Spleißisoformen in den NIH3T3-pEJ Zellen exprimiert werden, wurde eine RT-PCR durchgeführt. Dabei wurden Primer verwendet, die die Region von Exon 8 bis Exon 11 umspannen (Abbildung 25). Anhand der Größe der PCR Produkte sollten die verschiedenen Isoformen zweifelsfrei zu identifizieren sein.

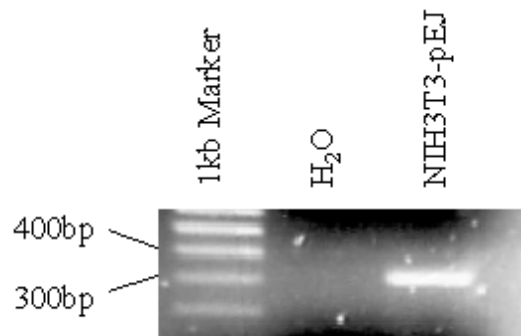


Abbildung 26: RT-PCR Analyse der B-Raf mRNA Expression mit den Primern O5 und O10 in NIH3T3-pEJ Zellen. Mittels der hier gewählten Primer können alle 4 unterschiedlichen Spleißisoformen nachgewiesen werden.

Die RT-PCR Analyse zeigt, dass in den NIH3T3-pEJ Zellen nur eine B-Raf Isoform in einer nachweisbaren Menge exprimiert wird (Abbildung 26). Das PCR-Produkt weist eine Größe von etwas über 300pb auf, was dafür spricht, dass es sich bei dem Transkript um B-Raf B1 handelt. Diese Isoform besitzt keines der beiden alternativen Exons. Um dieses Ergebnis zu überprüfen, wurden zusätzlich Primer eingesetzt, die spezifisch für das Exon 8b (O7) bzw. das Exon 10 (O17) sind. Mit den Primerpaaren O5 und O17 bzw. O7 und O10 konnte kein RT-PCR Produkt amplifiziert werden (Abbildung 27). Das lässt vermuten, dass weder Exon 8b noch Exon 10 in der B-Raf mRNA in NIH3T3-pEJ Zellen enthalten ist. Allerdings fehlt hier eine Positivkontrolle für die Exon 8b- bzw. 10-spezifische PCR, so dass diese Frage nicht abschließend geklärt werden konnte.

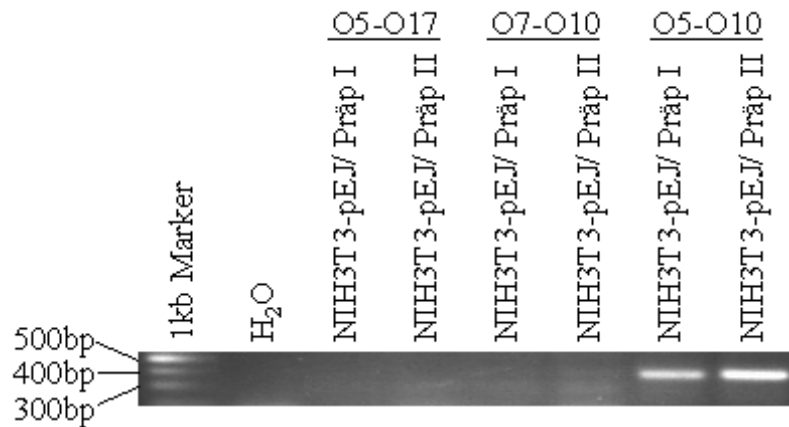


Abbildung 27: RT-PCR Analyse mit Exon 8b und 10 spezifischen Primern. Es wurden zwei voneinander unabhängig präparierte NIH3T3-pEJ RNA Proben verwendet. Das Primerpaar O5-O17 umfasst die Exons 8 bis Exon 10. In diesem Ansatz können also nur die Speißisoformen nachgewiesen werden, die das alternative Exon 10 besitzen. Mit dem Primerpaar O7-O10, die an Exon 8b und 11 binden, können dagegen nur die Transkripte nachgewiesen werden, die das alternative Exon 8b besitzen. Nur das Primerpaar O5-O10, das an Exon 8 und 11 bindet, erlaubt eine Amplifizierung aller alternativen Transkripte.

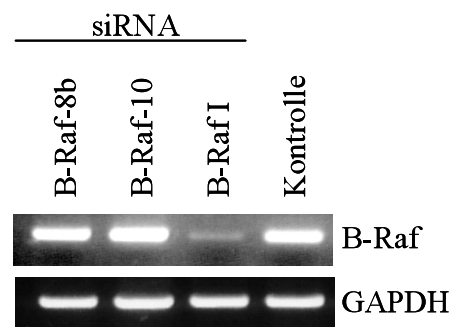


Abbildung 28: Einfluss der unterschiedlichen gegen B-Raf gerichteten siRNA Duplexe auf die Expression der B-Raf mRNA 24 Stunden nach der zweiten Transfektion. Die Zielsequenz der B-Raf-8b siRNA ist im alternativen Exon 8b lokalisiert, die B-Raf-10 siRNA ist gegen Exon 10 gerichtet. Um zu überprüfen, ob sich in jeder Probe die gleiche Menge RNA befand, wurde parallel eine RT-PCR mit GAPDH-spezifischen Primern durchgeführt.

Um diesen Befund zusätzlich abzusichern, wurde eine Hemmung der B-Raf mRNA mit siRNA Duplexen, die spezifisch für die Sequenzen der Exons 8b und 10 sind, durchgeführt. Hier ergab sich jedoch kein Effekt auf die B-Raf mRNA (Abbildung 28). Nur der siRNA Duplex B-Raf, der in Exon 4 liegt, führt zu einer Verminderung der B-Raf Expression.

3.2.7 Die Inhibition der A-Raf oder c-Raf-1 Isoform führt zur Apoptose in NIH3T3-pEJ Zellen

Die Inhibition der A-Raf und der c-Raf-1 Isoformen führt zu einer starken Reduktion der Zellzahl (Abbildung 20). In beiden Fällen wurde auch eine klare Veränderung der Zellmorphologie beobachtet (Abbildung 23). Während c-Raf-1 siRNA Duplexe stark vergrößerte Zellen hervorrufen (Abbildung 23c), beobachtet man nach A-Raf siRNA Transfektion ein Abrunden der Zellen (Abbildung 23a). Diese Beobachtung legt die Vermutung nahe, dass durch die Ausschaltung der A-Raf mRNA in den Zellen Apoptose induziert wird.

In Abbildung 29 sind schematisch die verschiedenen Signaltransduktionswege dargestellt, über die Apoptose induziert werden kann. Die Apoptose kann über einen rezeptorvermittelten Weg durch die Bindung von TNF α , β und den Fas Liganden (CD95L) an die entsprechenden Rezeptoren induziert werden. Des weiteren kann die Induktion der Apoptose über einen mitochondrialen Weg reguliert werden. Für A-Raf und c-Raf-1 wurde bereits eine wichtige, antiapoptotische Rolle postuliert, die an die Mitochondrien gekoppelt ist {Yuryev, 2000 #279} {Wang, 1996 #261}. Um zu untersuchen, ob die beiden Raf-Isoformen in den NIH3T3-pEJ Zellen die Apoptose über einen mitochondrialen Weg hemmen, und ob mögliche, isoformspezifische Unterschiede existieren, wurden Westernblot Analysen einiger Komponenten des mitochondrialen Weges durchgeführt (Abbildung 29).

Bad stellt ein proapoptotisches Mitglied der Bcl-2 Familie dar. In dem es an Bcl-xL oder Bcl-2 bindet, führt es unter anderem zur Ausschüttung von Cytochrom c aus den Mitochondrien und zum Zelltod. Über intrazelluläre Signaltransduktionswege kann Bad an zwei Aminosäuren (Ser 112 und Ser 136) phosphoryliert werden. Diese Phosphorylierungen bewirken eine Komplexbildung von Bad mit dem Protein 14-3-3 und hemmen somit die proapoptotische Funktion von Bad. Im Vergleich zur B-Raf siRNA resultiert die Inhibition von A-Raf und c-Raf-1 in einer verminderten Phosphorylierung von Bad an Serin 136 (Abbildung 30). Die Hemmung von A-Raf resultiert weiterhin in einer starken Spaltung der Caspase 9, wohingegen eine c-Raf-1 siRNA keinen Einfluss auf die Menge an aktiver Caspase 9 hat (Abbildung 30). Die Procaspase 9 wird im Kom-

plex mit Apaf1 durch Cytochrom c aktiviert und führt ihrerseits zur Spaltung der Caspasen 3 und 7.

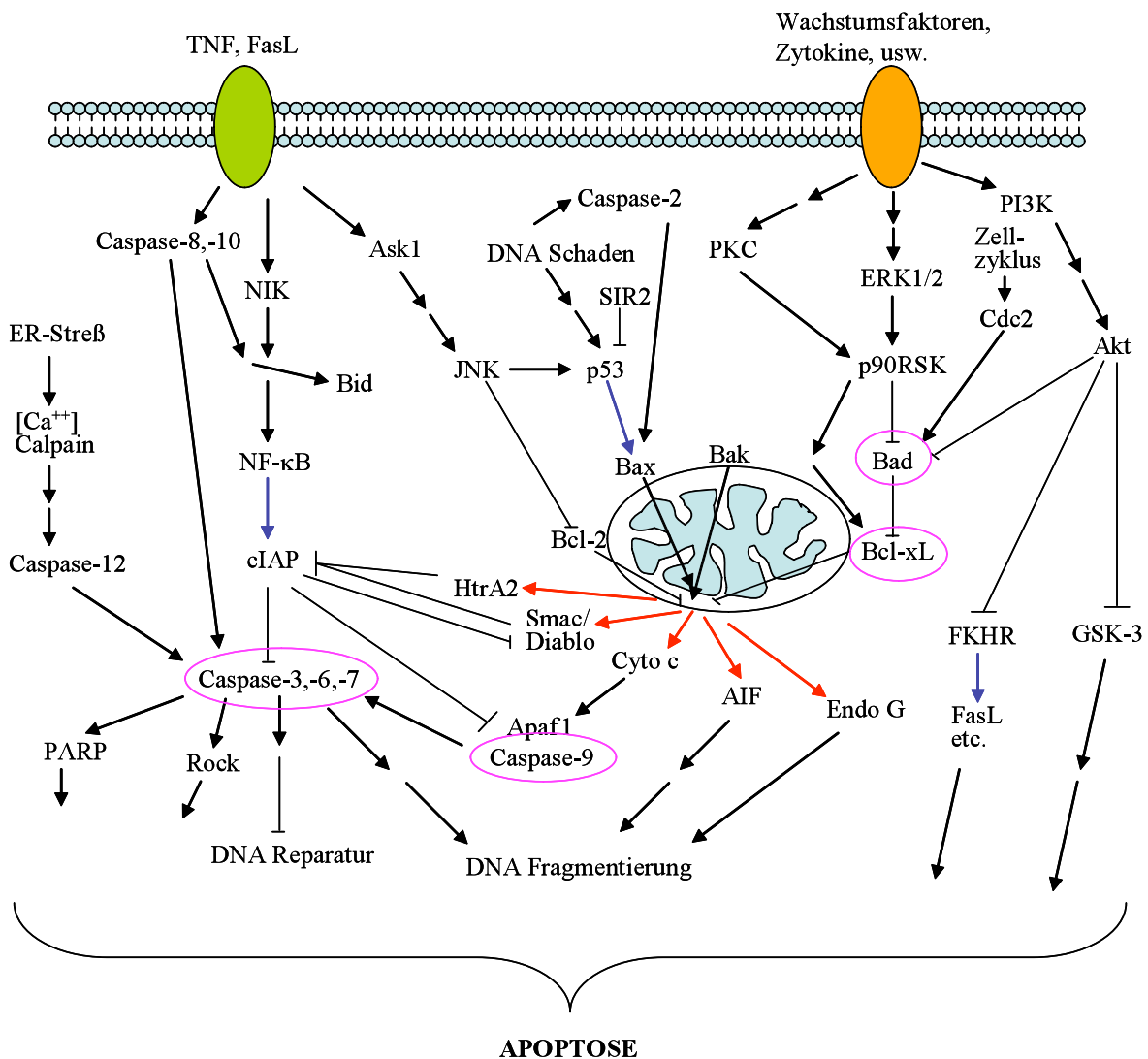


Abbildung 29: Schematische Darstellung der unterschiedlichen Signaltransduktionswege, die in der Regulation der Apoptose eine Rolle spielen. Die schwarzen Pfeile geben eine direkte, stimulatorische Modifikation wieder, während die blauen Pfeile für eine Stimulation der Transkription stehen. Die roten Pfeile symbolisieren die Translokation des jeweiligen Proteins. Die in dieser Arbeit analysierten Komponenten sind durch pinkfarbene Kreise markiert.

Die Caspasen 3 und 7 gehören zu den Hauptexekutoren der Apoptose und sind unter anderem für die Spaltung der nukleären poly(ADP-Ribose) Polymerase verantwortlich. Die Western Blot Analyse zeigt, dass die Inhibition der A-Raf-Isoform zu einer verstärkten Spaltung der Caspase 3 und

Caspase 7 führt. Die Inhibition von c-Raf-1 hat dagegen keinen Einfluss auf die Aktivierung der Caspase 7 (Abbildung 30).

A-Raf und c-Raf-1 scheinen ihre antiapoptotische Funktion über einen mitochondrialen Weg zu steuern. Jedoch unterscheiden sich die beiden Isoformen in der Effizienz der Spaltung der Aktivator- und Exekutorcaspasen.

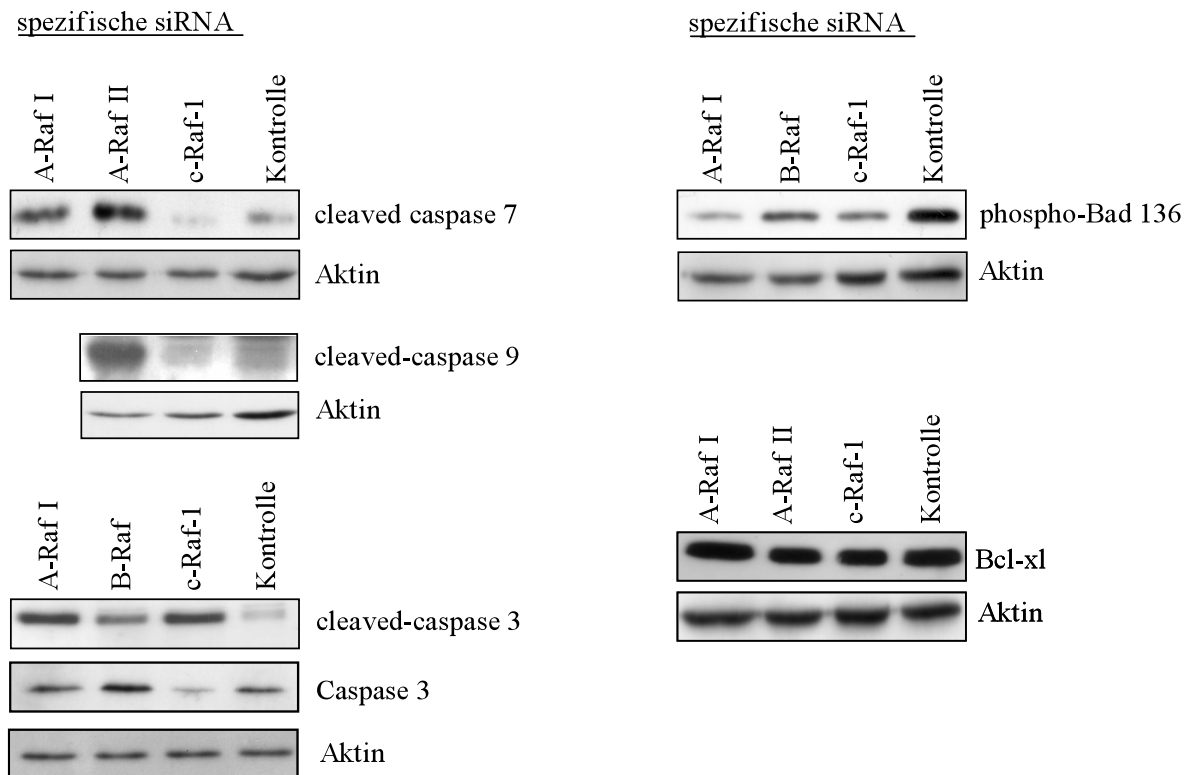


Abbildung 30: Western Blot Analyse der wichtigsten Aktivatoren und Effektoren der Apoptose. Proteinextrakte wurden 48 Stunden nach der zweiten Transfektion präpariert. Dabei wurden für den Nachweis der Caspasen Gesamtproteine mit CHAPS Puffer isoliert, während für Bcl-xl und Bad ein SDS-Sample Puffer für die Proteinextraktion benutzt wurde.

3.2.8 Aktivierte Raf Kinasen kooperieren in der Kontrolle der morphologischen Transformation

Wie bereits in Kapitel 3.2.4 beschrieben, führt die Inhibition der A-Raf Isoform zu einer vermehrten Abrundung der NIH3T3-pEJ Zellen (Abbildung 23a). Die Hemmung der c-Raf-1 Expression resultiert in mehrkernigen Zellen (Abbildung 23c). Für die Reversion des transformierten Phänotyps reicht

die Inhibition einer einzelnen Raf Kinase nicht aus (Abbildung 23). Hemmt man die Raf-Isoformen A-Raf und c-Raf bzw. B-Raf und c-Raf gleichzeitig, ist eine starke Abflachung der Zellen zu beobachten, die am ausgeprägtesten ist, wenn man alle drei Raf-Isoformen simultan ausschaltet (Abbildung 31). Im Gegensatz dazu, zeigt die gleichzeitige Transfektion von A-Raf und B-Raf spezifischen siRNA Duplexen nur einen geringen Einfluss auf die Morphologie der NIH3T3-pEJ Zellen (Abbildung 31a).

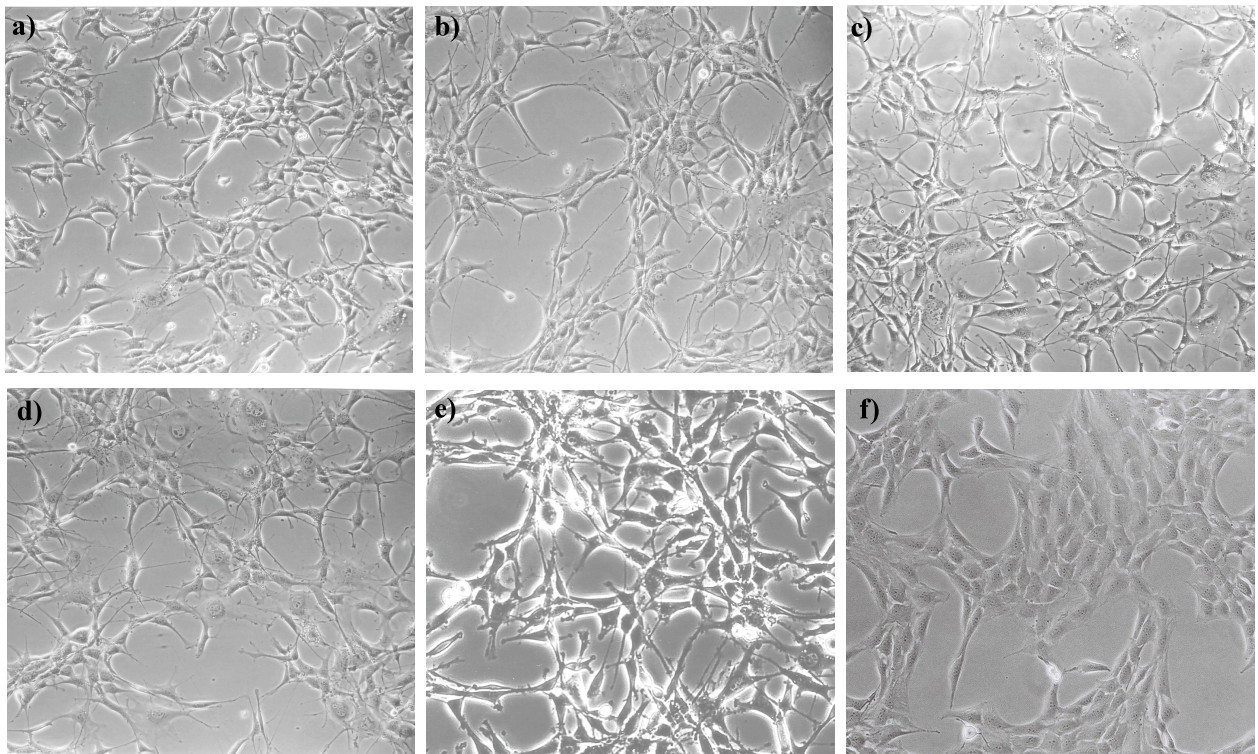


Abbildung 31: Morphologie von NIH3T3-pEJ Zellen 48 Stunden nach der zweiten Transfektion mit siRNA Duplexen spezifisch gegen A-Raf+B-Raf (a), A-Raf+c-Raf-1 (b), B-Raf+c-Raf-1 (c) und A-Raf+B-Raf+c-Raf-1 (d). Zum Vergleich wurde auch ein Foto der Kontrollzellen (e) und der immortalen NIH3T3 (f) hinzugefügt.

Betrachtet man den Einfluss der Inhibition zweier Raf-Isoformen auf die Aktivierung der Substratkinasen Erk1 und Erk2, so zeigt die gleichzeitige Ausschaltung der A- und der B-Raf Isoform keinen Einfluss auf die Phosphorylierung von Erk1 und Erk2 (Abbildung 32). Dagegen führt die Kombination der c-Raf-1 siRNA sowohl mit der A-Raf als auch mit der B-Raf siRNA zu einer starken Reduktion von aktiviertem Erk1 und Erk2, die jedoch durch die zusätzliche Inhibition der dritten Raf-Isoform nicht weiter reduziert wird (Abbildung 32).

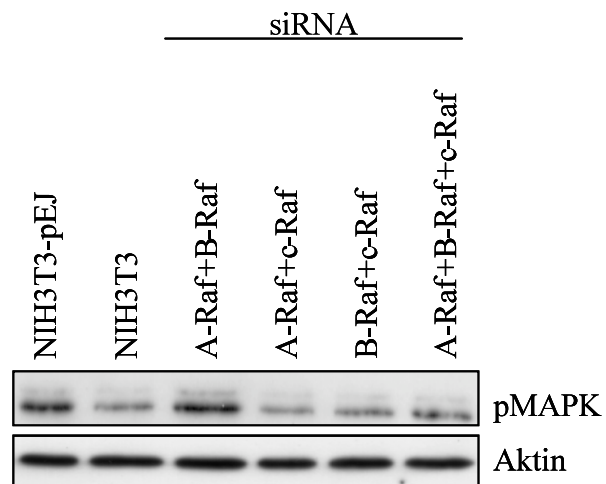


Abbildung 32: Western Blot Analyse der p42/p44-MAPK Expression 48 Stunden nach der zweiten Transfektion von NIH3T3-pEJ Zellen mit verschiedenen Kombinationen der siRNA Duplexe spezifisch gegen A-Raf, B-Raf und c-Raf-1. Als Kontrollen wurden zusätzlich Extrakte der Kontrollbehandelten NIH3T3-pEJ Zellen und der NIH3T3 Zellen geladen. Ein Aktinspezifischer Antikörper diente als Ladungskontrolle.

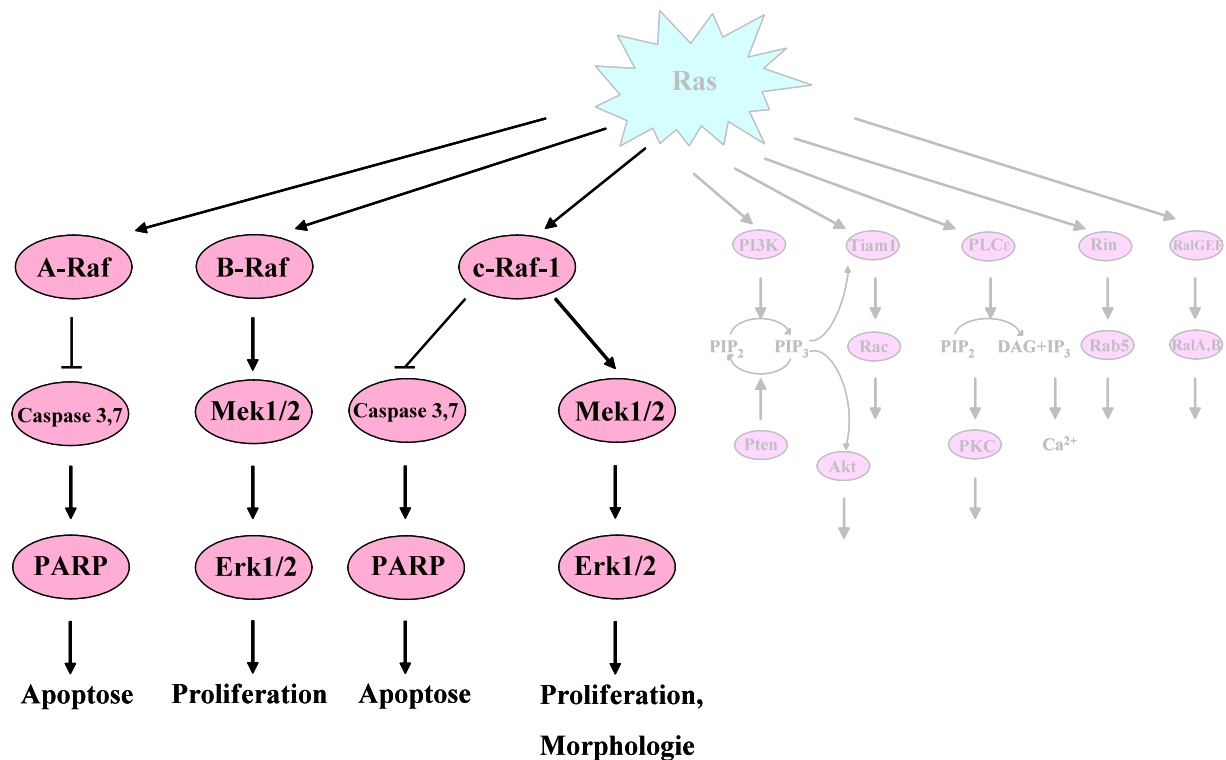


Abbildung 33: Zusammenfassende Darstellung der Auswirkungen der Hemmung von A-Raf, B-Raf und c-Raf-1 in den Ras-transformierten NIH3T3-pEJ Zellen.

Durch die Verwendung von Raf-isoformspezifischen siRNA Duplexen konnte gezeigt werden, dass sowohl die A-Raf als auch die c-Raf-1 Isoform eine wichtige Rolle für das Überleben der NIH3T3-pEJ Zellen spielen. Beide Isoformen besitzen antiapoptotische Funktionen. Ein Unterschied in der Wirkungsweise von A-Raf und c-Raf-1 in der Regulation der Apoptose konnte nicht gezeigt werden. Jedoch unterscheiden sich die beiden Isoformen in ihrer Fähigkeit, die beiden Substratkinasen Mek1 und Mek2 zu aktivieren. In den NIH3T3-pEJ zeigt die Inhibition der c-Raf-1 Isoform den stärksten Einfluss auf die Phosphorylierung der beiden Mek Kinasen. Die Applikation der B-Raf spezifischen siRNA zeigt dagegen nur einen geringeren Effekt auf die Menge an phospho-Mek1/2. Eine mögliche Erklärung hierfür, könnte die Anwesenheit nur einer von vier möglichen B-Raf Spleißisoformen sein, die eine relativ geringe Affinität zu Mek1 und Mek2 aufweist [Papin, 1998 #180].

3.3 Die Kinasen Mek1 und Mek2 haben unterschiedliche Rollen in der Regulation der Zellproliferation und in der Aktivierung ihrer Substratkinasen Erk1 und Erk2

In der Weiterleitung des mitogenen Signals stellen die beiden Kinasen Mek1 und Mek2 die wichtigsten Substrate der drei Raf-Proteine dar. Mittels Knockout-Studien konnte gezeigt werden, dass die Mek1 Isoform für die Entwicklung der Maus essentiell ist {Giroux, 1999 #73}, während Mek2 defiziente Mäuse keinen ersichtlichen Phänotyp aufwiesen {Belanger, 2003 #18}. Die Ausschaltung beider Mek Kinasen mittels RNA Interferenz in humanen Zellen resultiert in einer Deregulation des Zellzyklus {Ussar, 2004 #252}. Welche Rolle die beiden Mek Kinasen in der Weiterleitung des mitogenen Signals in den NIH3T3-pEJ Zellen spielen und ob Unterschiede in der Funktionsweise zwischen den beiden Kinasen bestehen sollte durch die siRNA-vermittelte Hemmung von Mek1 und Mek2 untersucht werden.

Die beiden Mek-Isoformen Mek1 und Mek2 weisen zueinander eine Homologie von 90% auf. Um eine isoformspezifische Inhibition zu gewährleisten, wurden die siRNA Duplexe gegen mRNA Abschnitte gerichtet, die nicht in den homologen Bereichen liegen.

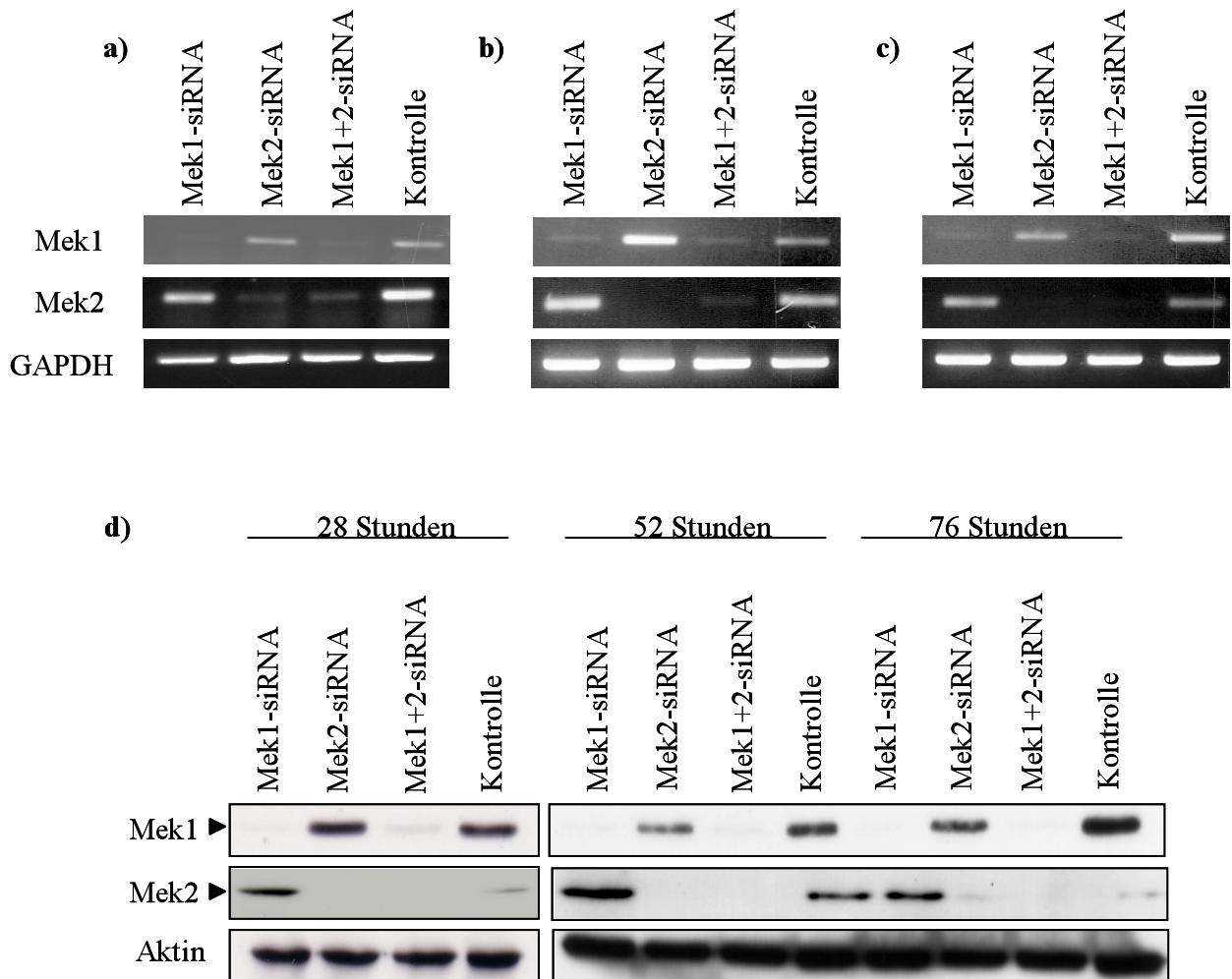


Abbildung 34: Nachweis der Inhibition der Kinase Isoformen Mek1 und Mek2 auf RNA (a, b, c) und Proteinebene (d). NIH3T3-pEJ Zellen wurden mit Mek1 und Mek2 siRNA Duplexen transfiziert und die RNA 28 (a), 52 (b) und 76 Stunden (c) nach der zweiten Transfektion präpariert. Mittels RT-PCR wurde die mRNA Expression von Mek1 und Mek2 bestimmt. Zu den gleichen Zeitpunkten wurden auch Proteine gewonnen und mittels Western Blot Analyse die Expression der Mek1 und Mek2 Proteine untersucht (d).

Die Transfektion der siRNA Duplexe gegen Mek1 und Mek2 führt zu einem fast vollständigen Abbau der jeweiligen RNA (Abbildung 34a, b, c). Bereits 28 Stunden nach der zweiten Transfektion konnte nur noch eine geringe Menge an Mek1- bzw. Mek2-mRNA nachgewiesen werden (Abbildung 34a). Diese starke Reduktion der mRNA hält über 48 Stunden an (Abbildung 34b, c). Der Proteinnachweis mittels Westernblot zeigt ebenfalls eine hohe Effizienz der beiden siRNA Duplexe (Abbildung 34d). Hier konnte über einen Zeitraum von 76 Stunden nach der Transfektion der spezifischen siRNA weder Mek1 noch Mek2 nachgewiesen werden (Abbildung 34d).

Auch die simultane Applikation von Mek1 und Mek2 siRNA Duplexen hat keinen negativen Einfluss auf die hohe Effizienz der beiden siRNA Duplexe. Sowohl die mRNA als auch die Proteine beider Kinasen sind über einen Zeitraum von mindestens 48 Stunden fast vollständig inhibiert (Abbildung 34).

Interessanterweise führt die Inhibition der Mek1 Isoform zu einer leicht verstärkten Expression des Mek2 Proteins über den gesamten Zeitraum der Inhibition (Abbildung 34d). Jedoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Behandlung der Zellen mit Transfektionreagenz (Kontrolle) einen negativen Einfluss auf die Mek2 Expression hat. Hierfür müsste die Mek1/2 Expression auch in unbehandelten Zellen analysiert werden. Die Applikation Mek2 spezifischer siRNA Duplexe hat dagegen keinen Einfluss auf die Menge an Mek1 Protein.

Für beide Mek-Isoformen wurde ein zweiter siRNA Duplexe hergestellt, um sicherzustellen, dass die beobachteten Effekte für die Inhibition der jeweiligen Isoform spezifisch sind und nicht durch *off-target* Regulation hervorgerufen werden {Jackson, 2003 #100}.

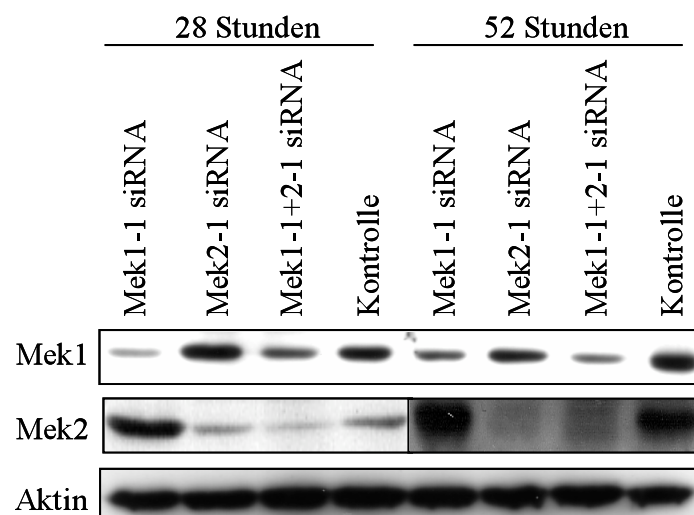


Abbildung 35: Westernblot Analyse der Mek1 und Mek2 Proteinexpression nach der Transfektion weiterer Mek1 und Mek2 spezifischer siRNA Duplexe. Gesamtextrakte wurden zu den angegebenen Zeitpunkten nach der zweiten Transfektion isoliert. Der Nachweis einer gleichmäßigen Beladung der unterschiedlichen Proben erfolgte mittels eines aktinspezifischen Antikörpers.

Auch diese siRNA Duplexe führen zu einer deutlichen Inhibition der Mek1 und Mek2 Proteinexpression (Abbildung 35). Wie schon bei dem ersten Mek1 spezifischen siRNA Duplex, konnte auch nach der Transfektion der Mek1-1-siRNA eine deutlich verstärkte Mek2 Expression nach-

gewiesen werden. Die beiden unterschiedlichen siRNA Duplexe für beide Isoformen weisen also eine vergleichbare Effizienz auf (Abbildung 34, Abbildung 35).

3.3.1 Die Inhibition der Mek2 Isoform hemmt das Wachstum von NIH3T3-pEJ Zellen

Die Transfektion beider gegen Mek2 gerichteten siRNA Duplexe resultiert in einer starken Zellzahlreduktion von fast 60% gegenüber den NIH3T3-pEJ Kontrollzellen (Abbildung 36). Dagegen hat die Inhibition der Mek1 Isoform nur einen sehr geringen Einfluss auf die Zellzahl. Beide Mek1 spezifischen Duplexe führen zu einer Zellzahlreduktion von 10-20% (Abbildung 36).

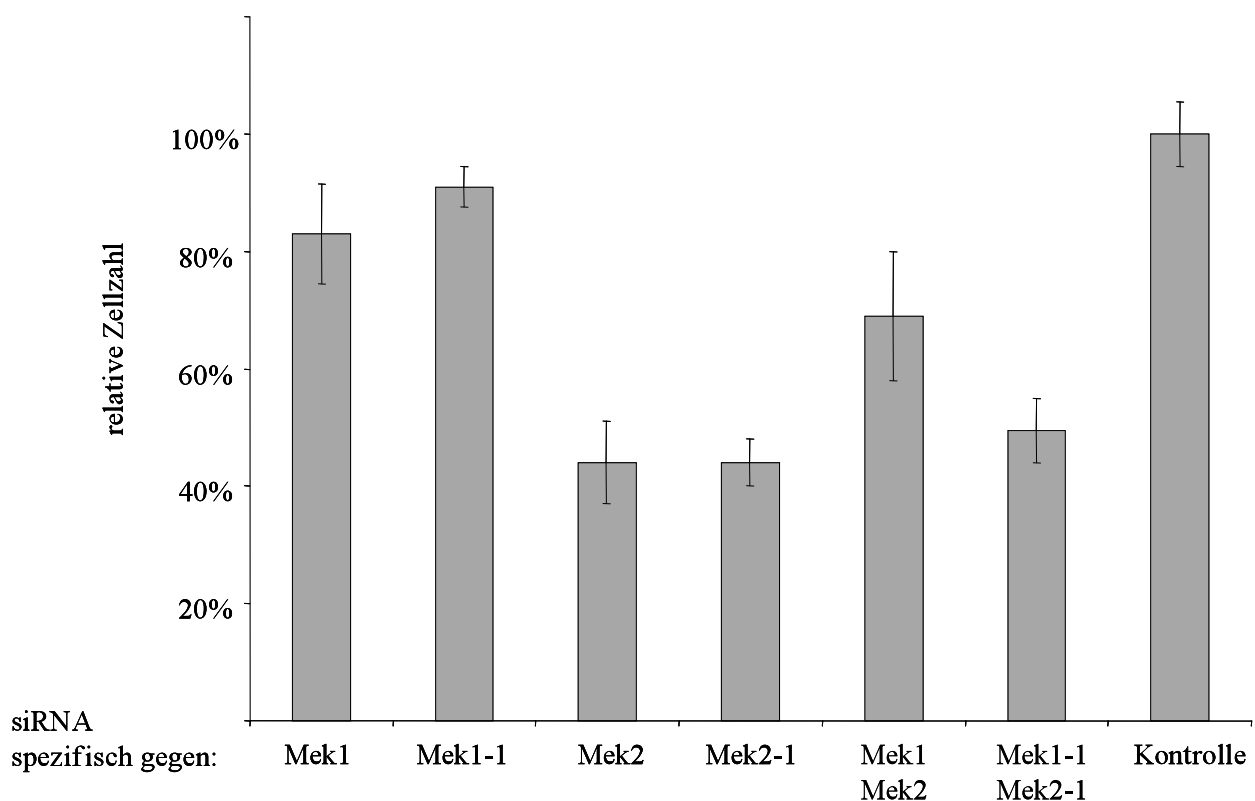


Abbildung 36: Graphische Darstellung der relativen Zellzahl 48 Stunden nach der Transfektion von Mek1 und Mek2 spezifischen siRNA Duplexen. Die Probe mit der höchsten Zellzahl wurde gleich 100% gesetzt und die anderen Proben dazu in Relation gesetzt.

Überraschenderweise zeigt die gleichzeitige Transfektion von Mek1 und Mek2 spezifischen siRNA Duplexen keinen additiven Effekt auf das Wachstum der NIH3T3-pEJ Zellen (Abbildung 36).

Die Inhibition der Mek2 Isoform hat also einen deutlich stärkeren Einfluss auf das Zellwachstum im Vergleich zur Mek1 Isoform.

Betrachtet man das Wachstum der Zellen über einen längeren Zeitraum nach der Transfektion so zeigt sich auch hier, dass die Inhibition der Mek2 Kinase einen wesentlich größeren Einfluss auf die Proliferation der Zellen hat (Abbildung 37). Die Transfektion von Mek2 spezifischen siRNA Duplexen führt zu einem vollständigen Stopp der Proliferation. Die Inhibition der Mek1 Isoform zeigt 72 Stunden nach der 2. Transfektion dagegen nur einen leichten Einfluss auf die Zellproliferation (Abbildung 37). 24 Stunden später zeigt sich eine starke Hemmung des Wachstums (Abbildung 37). Die Transfektion von Mek1 spezifischen siRNA Duplexen hat also im Vergleich zur Mek2 Inhibition erst zu einem späteren Zeitpunkt einen deutlichen Einfluss auf die Zellproliferation (Abbildung 37). Die beiden Kinaseisoformen scheinen das Wachstum der NIH3T3-pEJ Zellen über unterschiedliche Mechanismen zu regulieren.

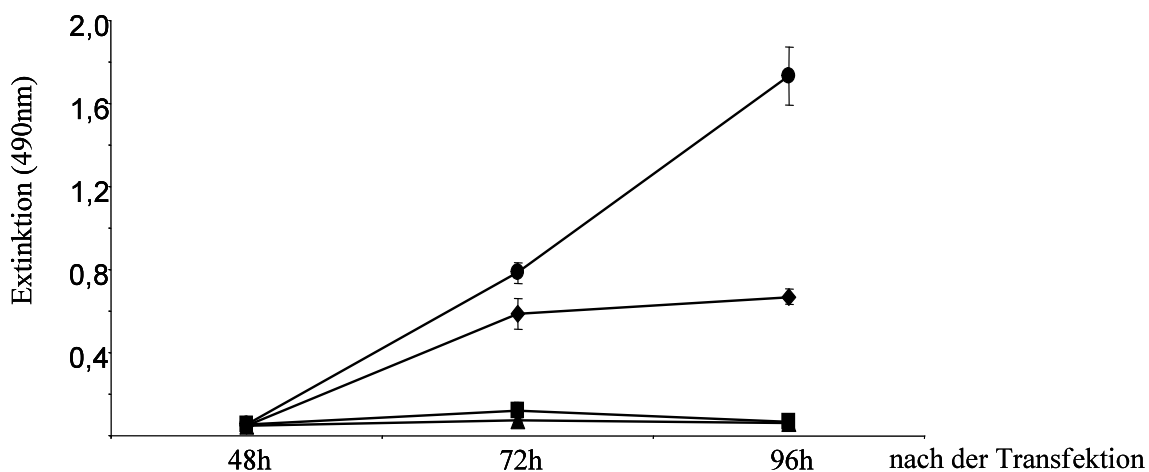


Abbildung 37: Wachstum von NIH3T3-pEJ Zellen 48 bis 96 Stunden nach der zweiten Transfektion von siRNA Duplexen spezifisch gegen Mek1 (Raute), Mek2 (Rechteck), Mek1+Mek2 (Dreieck) oder Kontrollzellen (Kreis). Die Zellen wurden zweimal in einem Abstand von 24 Stunden mit den jeweiligen Duplexen transfiziert und 24 Stunden nach der zweiten Transfektion auf 96well Platten ausplattiert. Zu den angegebenen Zeitpunkten nach der 2. Transfektion wurde das Zellwachstum mittels eines XTT-Assays bestimmt.

3.3.2 Das verankerungsunabhängige Wachstum der NIH3T3-pEJ Zellen wird durch die Inhibition der Mek2 Isoform vollständig gestoppt

Neben dem 2-dimensionalen Wachstum wurde auch der Einfluss der beiden Mek Isoformen auf das verankerungsunabhängige Wachstum auf polyHEMA-beschichteten Platten bestimmt. Auch hier führt die Inhibition der Mek2 Isoform zu einem vollständigen Stopp des 3-dimensionalen Wachstums (Abbildung 38). Dieser hält über einen Zeitraum von mindestens 96 Stunden nach der Transfektion der siRNA Duplexe an.

Dagegen resultiert die Applikation Mek1 spezifischer siRNA Duplexe zwar in einer signifikanten Inhibition des verankerungsunabhängigen Wachstums, allerdings wird hier die Proliferation nicht vollständig gestoppt. Die Wachstumskurve der mit Mek1-spezifischen siRNA-Duplexen behandelten Zellen verläuft genau zwischen der Kurve der Kontrollzellen und der mit Mek2-siRNA behandelten Zellen (Abbildung 38).

Beide Mek Kinasen spielen eine wichtige Rolle bei der Regulation des Zellwachstums, jedoch konnte kein Unterschied hinsichtlich des 2-dimensionalen und des 3-dimensionalen Wachstums festgestellt werden (Abbildung 37, Abbildung 38).

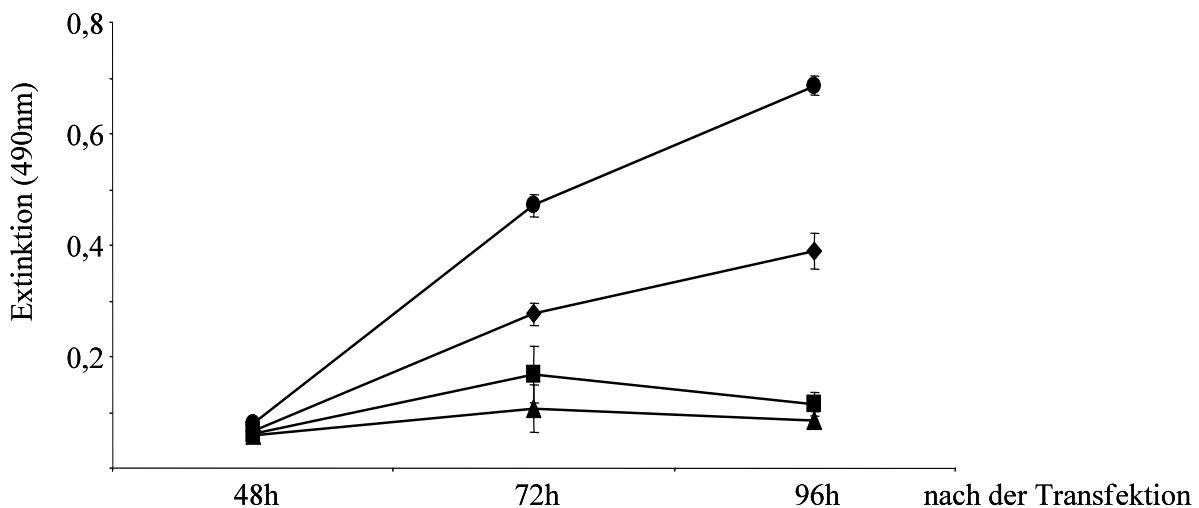


Abbildung 38: Verankerungsunabhängiges Wachstum von NIH3T3-pEJ Zellen 48 bis 96 Stunden nach der zweiten Transfektion von siRNA Duplexen spezifisch gegen Mek1 (Raute), Mek2 (Rechteck), Mek1+Mek2 (Dreieck) und von Kontrollzellen (Kreis). Die Zellen wurden zweimal in einem Abstand von 24 Stunden mit den jeweiligen Duplexen transfiziert und 24 Stunden nach der zweiten Transfektion auf 96well Platten ausplattiert. Zu den angegebenen Zeitpunkten nach der 2. Transfektion wurde das Zellwachstum mittels eines XTT-Assays bestimmt.

3.3.3 Die gleichzeitige Inhibition von Mek1 und Mek2 resultiert in einer Reversion des transformierten Phänotyps

Die Inhibition der Mek2 Isoform mittels RNA Interferenz resultiert nicht nur in einer starken Reduktion der Zellzahl (Abb. 36), sondern auch in einer deutlichen Veränderung der Morphologie (Abb. 39b). Die Zellen, die mit Mek2 spezifischen siRNA Duplexen transfiziert wurden, weisen ähnlich wie die mit der A-Raf siRNA behandelten Zellen (Abb. 23) einen abgerundeten Phänotyp auf. Das Ausschalten der Mek1 Isoform hat dagegen nur einen geringen Einfluss auf die Morphologie. Es scheint, dass die Zellfortsätze stärker ausgebildet sind und die Zellen einen schmalere Zellkörper aufweisen (Abb. 39a).

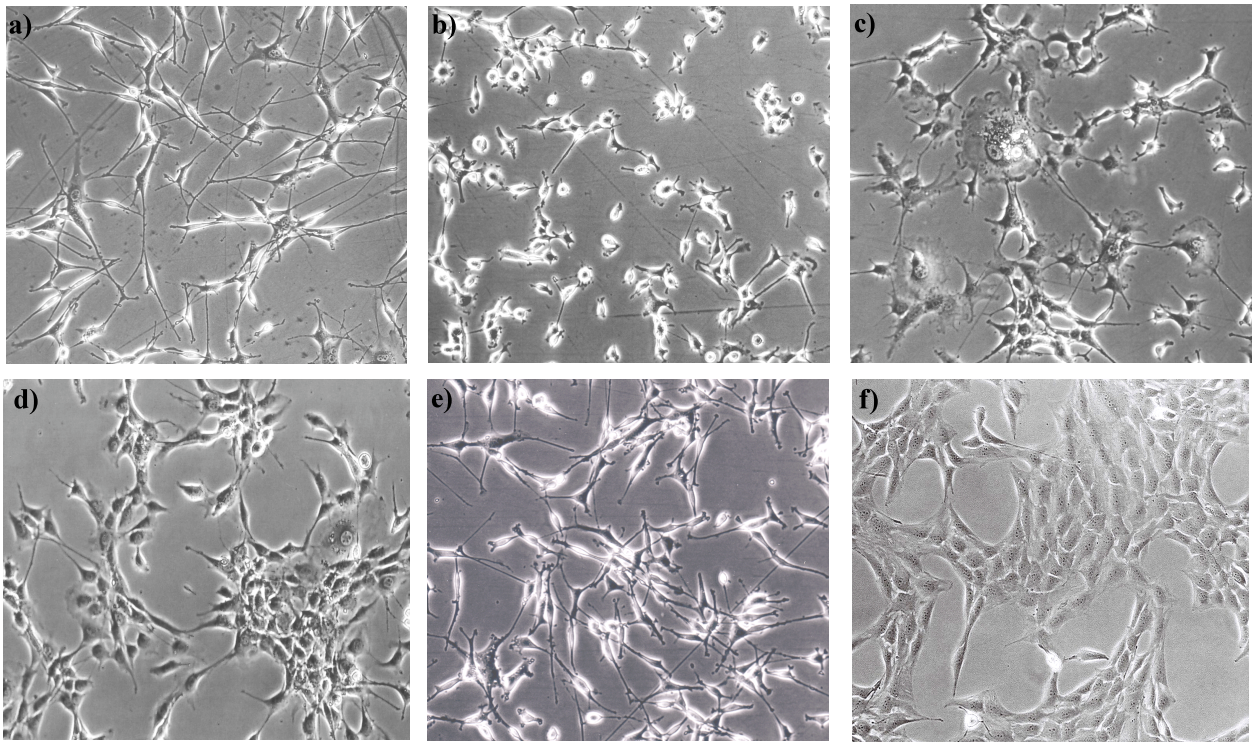


Abbildung 39: Morphologie der NIH3T3-pEJ Zellen 48 Stunden nach der zweiten Transfektion mit siRNA Duplexen spezifisch gegen Mek1 (a), Mek2 (b), Mek1+2 (c) im Vergleich zu Kontrollzellen (e) und nicht transformierten NIH3T3 (f). Zusätzlich wurde für die gleichzeitige Transfektion der Mek1 und Mek2 siRNA Duplexe die Morphologie 72 Stunden nach der zweiten Transfektion festgehalten (d).

Im Gegensatz dazu, führt die gleichzeitig Inhibition beider Mek Isoformen 48 Stunden nach der zweiten Transfektion zu einer heteromorphen Zellkultur. Manche Zellen weisen einen revertierten Phänotyp auf, während andere ihr transformiertes Erscheinungsbild behalten haben (Abbildung 39c). Zusätzlich treten eine Vielzahl von mehrkernigen Zellen auf. Wenn man die Morphologie dieser Zellkultur mit der der NIH3T3 Zellen vergleicht (Abbildung 39f), so kann man feststellen, dass 48 Stunden nach der zweiten Transfektion keine vollständige Reversion vorliegt. 72 Stunden nach der zweiten Applikation von Mek1+Mek2 siRNA Duplexen weist jedoch die Mehrzahl der Zellen eine abgeflachte Morphologie auf (Abbildung 39d) und vergleicht man diese erneut mit der Morphologie der NIH3T3 Zellen, so liegt hier eine weitgehende Reversion des transformierten Phänotyps vor (Abbildung 39d, f). Dieses korreliert gut mit den Effekten der beiden Mek Kinasen auf das 2- und 3-dimensionale Wachstum.

3.3.4 Das Ausschalten der Mek2 Isoform führt zu einer erhöhten Anzahl von Zellen in der G1 Phase des Zellzyklus

Wie in den Kapiteln 3.3.3 und 3.3.4 beschrieben, führt die Ausschaltung der Mek2 Isoform zu einer starken Zellzahlreduktion (Abbildung 36) und einer abgerundeten Zellmorphologie (Abbildung 39). Um nun die Zellzyklusverteilung nach Transfektion von Mek1 und Mek2 spezifischen siRNA Duplexen zu untersuchen, wurde eine Zellzyklus-Analyse mit dem Durchflusszytometer 48 Stunden nach der zweiten Transfektion durchgeführt (Tabelle 1).

Die Inhibition der Mek1 Isoform führt zu keiner signifikanten Änderung der Zellzyklusverteilung im Vergleich zu den Kontrollzellen (Tabelle 1). Die Mehrzahl der Zellen befindet sich in der G2-Phase (45,1 bzw. 46,3%), während sich ein geringerer Teil der Zellen in der S-Phase befindet (14 bzw 15,8%). Der Rest der Zellen ist in der G1-Phase (40,9 bzw. 37,9%). Wie schon in Kapitel 3.3.1 und 3.3.2 beschrieben, zeigt die Mek1 Isoform erst zu einem späteren Zeitpunkt einen starken Einfluss auf die Proliferation (Abbildung 37, Abbildung 38). Es wäre wichtig, die Zellzyklusverteilung kontinuierlich über einen Zeitraum von 48-96 Stunden nach der siRNA Transfektion zu untersuchen. Die Inhibition der Mek2 Isoform hat einen eindeutigen Einfluss auf den Zellzyklus und führt zu einer erhöhten Anzahl von Zellen in der G1-Phase und einer verminderten Anzahl von Zellen in der S-Phase. Jedoch konnte kein signifikanter Sub-G1-Peak beobachtet werden. Damit ist eine Rolle der Mek2 Isoform in der Kontrolle der Apoptose zumindestens 48 Stunden nach der siRNA Transfektion auszuschließen. Ein wenig anders verhält es sich bei der gleichzeitigen Ausschaltung beider Mek Isoformen. Auch hier nimmt die Anzahl an Zellen in der G1 Phase zu (48%), allerdings sinkt der Anteil der Zellen, die sich in der S-Phase und in der G2 Phase befinden (Tabelle 1). Die gleichzeitige Inhibition beider Mek Isoformen zeigt also keinen additiven

Effekt auf die Anzahl der Zellen in der G1-Phase, sondern hat als einzige Behandlung einen Einfluss auf die Anzahl der Zellen, die sich in der G2-Phase befinden.

Tabelle 1: Prozentuale Verteilung von NIH3T3-pEJ Zellen in der G1, G2 und S-Phase 48 Stunden nach der Transfektion mit Mek1, Mek2 oder Mek1+2 spezifischen siRNA Duplexen. Als Kontrolle dienten mit Oligofectamine transfizierte NIH3T3-pEJ Zellen.

	Mek1-siRNA	Mek2-siRNA	Mek1+2-siRNA	Kontrollzellen
G1-Phase	40,9%	51,5%	48,3%	37,9%
G2-Phase	14,0%	14,6%	11,5%	15,8%
S-Phase	45,1%	33,9%	40,2%	46,3%

3.3.5 Mek2 hat eine dominante Rolle in der Aktivierung der Substratkinasen Erk1 und Erk2

Mek1 und Mek2 phosphorylieren und aktivieren die beiden Kinasen Erk1 und Erk2 {Zheng, 1993 #287} {Robinson, 1996 #198}. Ob es einen Unterschied zwischen den beiden Mek Isoformen betreffend ihrer Affinität zu den beiden Substratkinasen Erk1/2 gibt, wird bisher kontrovers diskutiert. Mek1 spielt offenbar eine wichtige Rolle bei der Weiterleitung des Raf-abhängigen, mitogenen Signals {Jelinek, 1994 #104} {Cowley, 1994 #42} {Coles, 2002 #41} {Marais, 1996 #147}. Im Gegensatz dazu, konnten andere Arbeitsgruppen zeigen, dass Mek2 ein wesentlich stärkerer Aktivator von Erk1/2 ist als Mek1 {Khokhlatchev, 1997 #115} {Ussar, 2004 #252}. Überraschenderweise konnte weder in Mek1- noch in Mek2-defizienten Mäusen eine Änderung der Erk1/2 Aktivität beobachtet werden {Giroux, 1999 #73} {Belanger, 2003 #18}. Für die spezifische Analyse einer Mek1- oder Mek2-abhängigen Erk-Aktivierung wurden die beiden Mek Isoformen a) unabhängig voneinander und b) gemeinsam über siRNA gehemmt. Die Erk1/2 Aktivierung wurde dann 28, 52 und 76 Stunden nach der zweiten Transfektion mittels Western Blot Analyse untersucht (Abbildung 40).

Auch hier hat wie schon bei der Proliferation (Abbildung 36) die Inhibition der Mek1 Isoform einen sehr viel geringeren Einfluss als die Ausschaltung der Mek2-Isoform (Abbildung 40). Die Menge an phosphoryliertem Erk1 und Erk2 ist nur 52 Stunden nach der zweiten Transfektion von Mek1-siRNAs leicht reduziert (Abbildung 40). Länger hält dagegen der Einfluss der Mek1-Inhibition auf die Menge an phosphoryliertem Mek1/2 an. 52 Stunden nach der zweiten Transfektion ist ein fast vollständiger Verlust an phospho-Mek1/2 zu erkennen und auch 24 Stunden später ist die Menge an aktiviertem Mek1/2 noch reduziert (Abbildung 40). Im Gegensatz dazu, zeigt die Inhibition der Mek2 Isoform einen deutlichen Einfluss auf die Erk1/2 Aktivierung. 52 und 76 Stunden nach der Transfektion von Mek2 spezifischen siRNA Duplexen ist die Menge an phosphoryliertem Erk1 und Erk2 im Vergleich zu den Kontrollzellen reduziert (Abbildung 40). Auch die Gesamtmenge an phosphoryliertem Mek1/2 ist zu diesem Zeitpunkt vermindert, scheint jedoch einer etwas anderen Kinetik zu folgen als die Erk1/2 Phosphorylierung.

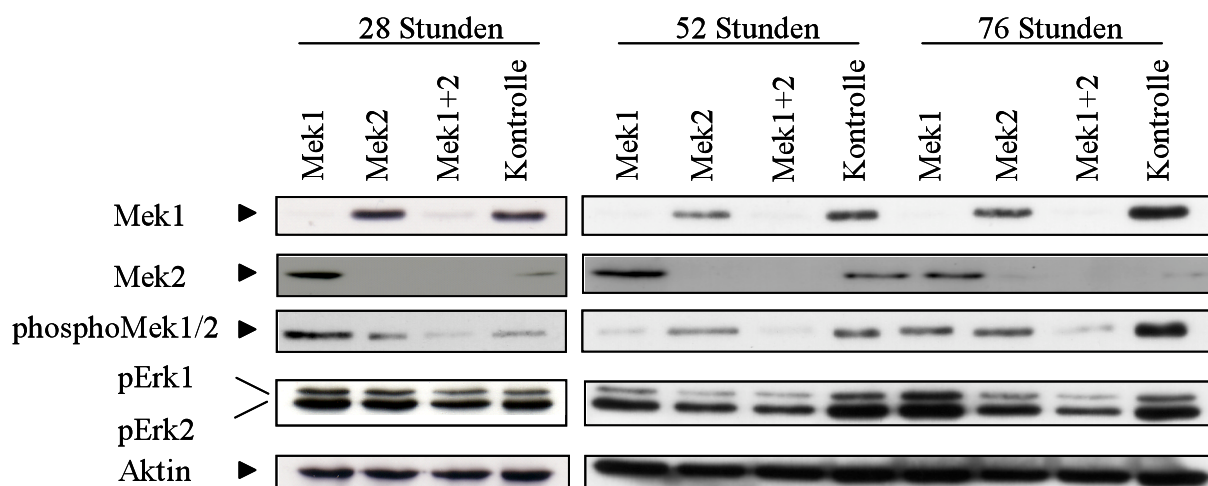


Abbildung 40: Western Blot Analyse der NIH3T3-pEJ Zellen 28, 52 und 76 Stunden nach der zweiten Transfektion mit siRNA Duplexen spezifisch gegen Mek1 und Mek2. Die Expression von Mek1, Mek2, phospho Mek1/2 und phospho Erk1/2 wurde mittels spezifischen Antikörpern nachgewiesen. Als Ladungskontrolle diente ein aktinspezifischer Antikörper.

In Bezug auf die Aktivierung ihrer Substratkinasen scheint die gleichzeitige Inhibition der beiden Mek Isoformen einen additiven Effekt zu haben. 52 und 76 Stunden nach der zweiten Transfektion konnte eine starke Abnahme an phosphoryliertem Erk1/2 festgestellt werden. Dabei ist die Reduktion an phospho-Erk1/2 stärker als bei der Inhibition der Mek2 Isoform allein. Allerdings überrascht es, dass aktives Erk1/2 3 Tage nach dem Verlust der Aktivatorkinasen immer noch

nachweisbar ist. Die simultane Ausschaltung beider Mek Isoformen führt zu einem fast vollständigen Verlust der phospho-Mek1/2 Expression über einen Zeitraum von mindestens 48 Stunden. Obwohl sich schon 24 Stunden nach der zweiten Transfektion kaum mehr aktives Mek1/2 in der Zelle befindet, bleibt immer noch eine deutliche Restmenge an phosphoryliertem Erk1/2 über die Dauer des ganzen Experiments in der Zelle vorhanden.

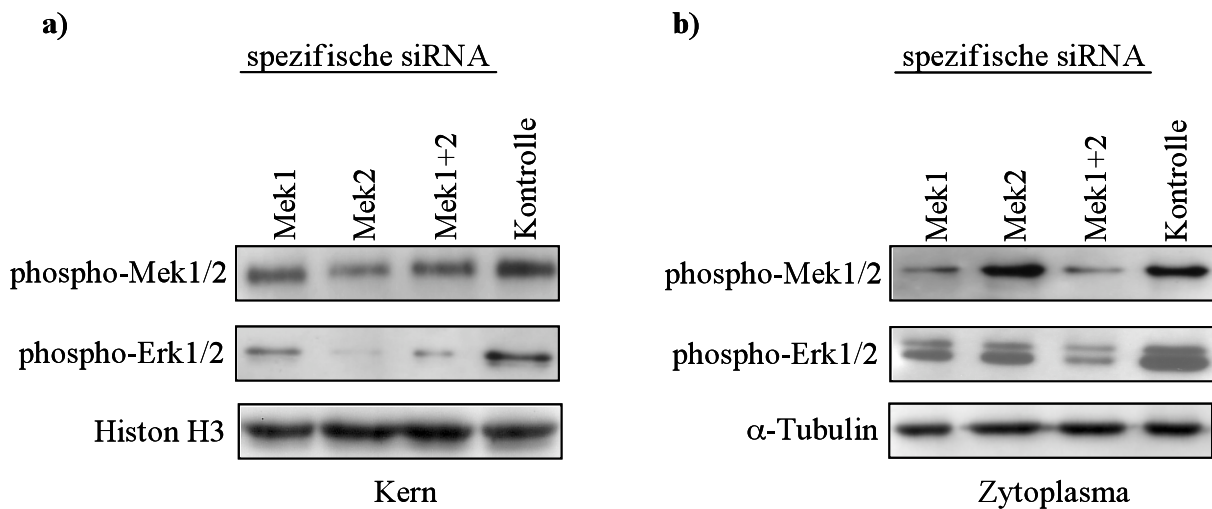


Abbildung 41: Western Blot Analyse kernständiger (a) und zytoplasmatischer (b) Proteine 48 Stunden nach der zweiten Transfektion von NIH3T3-pEJ Zellen mit siRNA Duplexen spezifisch gegen Mek1 und Mek2. Mittels spezifischer Antikörper wurde die Expression von phospho-Mek1/2 und phospho-Erk1/2 nachgewiesen. Die gleichmäßige Beladung wurde für die nukleären Proteine mittels eines Histon H3-spezifischen und für die zytoplasmatischen Proteine durch einen α -Tubulin-spezifischen Antikörper kontrolliert.

Nach Serumstimulation wandert phosphoryliertes Erk1/2 schnell in den Zellkern, um etwa drei Stunden später immer noch in seiner aktiven Form ins Zytoplasma zurückzugelangen {Volmat, 2001 #257}. Aktiviertes Erk1/2 kann also im Zellkern und im Zytoplasma lokalisiert sein. Um nun zu untersuchen, ob die Hemmung von Mek1 oder Mek2 einen Einfluss auf die Lokalisation von phospho-Erk1/2 hat, wurden die Zellen 52 Stunden nach der 2. Transfektion der Mek siRNAs fraktioniert und die zytoplasmatischen und kernständigen Proteine isoliert (Abbildung 41). Damit sollte gezeigt werden, in welchem Kompartiment sich das restliche phospho-Erk1/2 nach der gleichzeitigen Ausschaltung beider Mek-Isoformen befindet. Möglicherweise gibt es einen Stabi-

litätsunterschied zwischen dem im Zytoplasma befindlichen und dem nukleär lokalisierten phosphorylierten Mek1/2, daher wurde auch phopho-Mek1/2 analysiert.

Die Transfektion von Mek1-spezifischen siRNA Duplexen resultiert in einer starken Abnahme von aktivem Mek1/2 im Zytoplasma (Abbildung 41b), während sich die Menge an aktivem Mek1/2 im Zellkern wenig reduziert (Abbildung 41a). Die Inhibition von Mek2 führt dagegen zu einer Reduktion des kernständigen phospho-Mek1/2 (Abbildung 41a), hat allerdings keinen Einfluss auf das zytoplasmatische, aktive Mek1/2 (Abbildung 41b). Interessanterweise hat die gleichzeitige Hemmung beider Mek Kinasen keinen additiven Effekt auf die Aktivierung von Mek1/2 (Abbildung 41a, b). Die Menge an phosphoryliertem Erk1/2, das sich im Zytoplasma befindet, wird nur geringfügig durch die Ausschaltung der beiden Mek Isoformen gegenüber der Kontrollprobe reduziert (Abbildung 41b). Allerdings zeigt sich hier ein additiver Effekt der Mek-Isoformen, da die gleichzeitige Hemmung beider Kinasen in einer wesentlich stärkeren, zytoplasmatischen Inaktivierung der beiden Substratkinasen Erk1/2 resultiert (Abbildung 41b). Im Gegensatz zum Zytoplasma liegt im Kern hauptsächlich aktiviertes Erk1 vor. Phosphoryliertes Erk2 konnte in den Kontrollzellen nur in sehr geringen Mengen nachgewiesen werden (Abbildung 41a). Die Inhibition der Mek2 Isoform allein oder beider Mek Isoformen gleichzeitig führt zu einem fast vollständigen Verlust an aktivem Erk1 und Erk2 im Zellkern, während die Ausschaltung der Mek1 Isoform einen geringeren Einfluss hat (Abbildung 41a). Dieses Experiment zeigte, dass sich der Hauptteil des verbleibenden, aktiven Erk1/2 nach der simultanen Inhibition beider Mek Isoformen im Zytoplasma befindet, damit können die Erk Proteine eine wichtige Funktion, die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, nicht mehr ausüben. Dieser Befund könnte die Ursache für die beobachtete morphologische Reversion der Zellen nach Mek1/2 Hemmung sein.

3.3.6 Die Aktivierung von Mek2 spielt eine Rolle in der Stimulation von PKC

Die Beobachtung, dass sich auch 48 Stunden nach voller Suppression von Mek1,2 noch nachweisbare Mengen an phospho-Erk1,2 im Zytoplasma befinden, ist überraschend. Hinweise auf eine Mek-unabhängige Aktivierung von Erk1,2 gibt es aus verschiedenen Zellsystemen (Grammer und Blenis, 1997). Die langanhaltende Aktivierung der MAPK nach Stimulation von Swiss 3T3 Fibroblasten mit PDGF wird über einen Mek-unabhängigen, aber PI(3) Kinase- und cPKC-abhängigen Weg reguliert {Grammer, 1997 #76}. Außerdem inhibieren dominant-negative Mutanten von PKC epsilon und zeta die durch konstitutiv-aktives c-Raf-1 vermittelte Aktivierung von Erk1/2 {Kampfer, 2001 #111}. Auch die Aktivierung von Erk1/2 durch konstitutiv aktives Mek1

wird durch eine dominant-negative Mutante von PKC zeta gehemmt {Kampfer, 2001 #111}. Aufgrund dieser Befunde wurde analysiert, ob die Inhibition der Mek1 und Mek2 Kinase einen Effekt auf die Phosphorylierung verschiedener PKC-Isoformen hat (Abbildung 42). Da der PKC zeta spezifische Antikörper keine Spezifität gegenüber dem Mausprotein aufwies, wurden nur die beiden Isoformen epsilon und alpha untersucht.

Die Inhibition der Mek1 Isoform mittels RNA Interferenz induziert eine leichte Erhöhung an phosphoryliertem PKC-epsilon und PKC alpha (Abbildung 43). Der Einfluss der Inhibition der Mek2 Isoform auf die Phosphorylierung dieser beiden PKC Isoformen ist dagegen sehr viel stärker. Die simultane Ausschaltung beider Mek Isoformen hat jedoch keinen additiven Effekt auf die Aktivierung der PKC Isoformen. Die Inhibition der beiden Mek Isoformen führt also zu einer Induktion der Aktivierung bestimmter PKC Isoformen, die möglicherweise den Verlust der Mek Isoformen in Bezug auf die Erk Aktivierung kompensieren könnten. Für einen Nachweis dieser Hypothese müsste zusätzlich zu Mek1,2 auch PKC ausgeschaltet werden und anschließend die Phosphorylierung von Erk1 und Erk2 nachgewiesen werden.

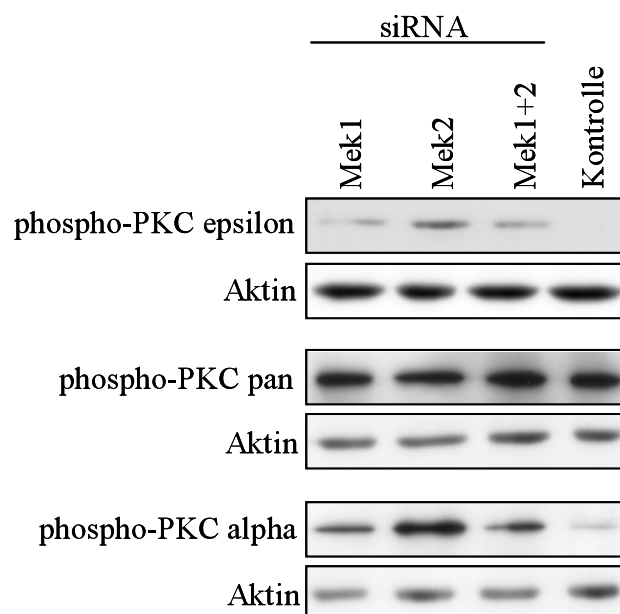


Abbildung 42: Western Blot Analyse der Aktivierung von PKC epsilon und alpha. Gesamtextrakte wurden 52 Stunden nach der zweiten Transfektion mit siRNA Duplexen spezifisch gegen Mek1 und Mek2 präpariert. Als Ladungskontrolle diente ein aktinspezifischer Antikörper.

3.3.7 Der Einfluss der beiden Mek Isoformen auf die Aktivierung von potentiellen Zielproteinen

Wie in Kapitel 3.3.6 beschrieben führt die Inhibition von Mek2 zu einer starken Hemmung des Zellwachstums, während die Mek1 spezifische siRNA erst zu einem wesentlich späteren Zeitpunkt auf die Proliferation wirkt. Dieses Ergebnis spricht für eine unterschiedliche Wirkungsweise der beiden Kinasen. Daher wurde die Auswirkung einer Mek1 oder Mek2 Hemmung auf die Expression des Zellzyklusregulators Cyclin D1 analysiert (Abbildung 43). Die Expression von Cyclin D1 ist nach der Inhibition von Mek2 stark inhibiert. Die Mek1 Isoform hat dagegen keinen Einfluss auf die Menge an Cyclin D1 Protein. Desweiteren konnte kein additiver Effekt beider Mek Isoformen in Bezug auf die Cyclin Expression festgestellt werden (Abbildung 43).

Neben dem Unterschied in der Zellzyklusregulation ist auch der starke Einfluss der Mek2 Isoform auf die Aktivierung von Erk1,2 im Zellkern von Bedeutung. Die beiden Erk Isoformen können eine wichtige Aufgabe, die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren nicht ausüben. Die Inhibition der beiden Mek Isoformen getrennt voneinander oder zusammen hat jedoch keinen Einfluss auf die Expression des Transkriptionsfaktors CREB-1 (Abbildung 43).

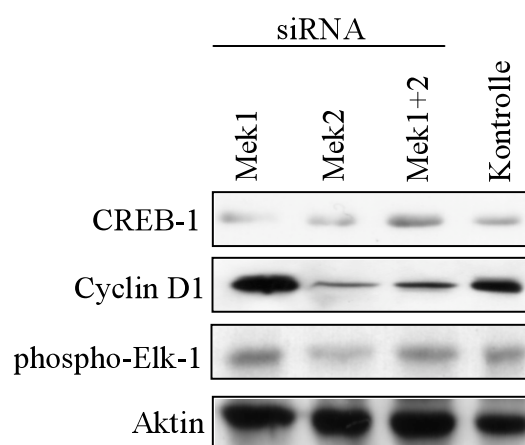


Abbildung 43: Western Blot Analyse der Expression von CREB-1, Cyclin D1 und phospho-Elk1 52 Stunden nach der zweiten Transfektion von siRNA Duplexen spezifisch gegen Mek1 und Mek2 in NIH3T3-pEJ Zellen. Als Ladungskontrolle diente ein aktinspezifischer Antikörper.

Die Aktivierung des Transkriptionsfaktor Elk1 wird nur durch die Transfektion Mek2 spezifischer siRNA Duplexe leicht inhibiert. Die Ausschaltung der Mek1 Isoform hat dagegen keinen Einfluss auf die Phosphorylierung von Elk1.

Da die Hemmung von Mek2 einen größeren Effekt auf die Menge an aktivem Erk1/2 im Kern hat (Abbildung 41), überrascht es nicht, dass sie sich auch stärker auf die Expression bzw. Aktivierung von durch Erk1/2 regulierten Transkriptionsfaktoren bzw. Zellzyklusregulatoren auswirkt. Die beiden Mek Isoformen beeinflussen die Proliferation der NIH3T3-pEJ Zellen über unterschiedliche Mechanismen. Während Mek2 den klassischen, gut untersuchten Raf-Mek-Erk- Weg steuert, bleiben die durch Mek1 kontrollierten Komponenten unbekannt. Alternativ führt die Kompensation der Mek1 Hemmung zu einer so starken Mek2 Aufregulation, dass keine Effekte sichtbar sind.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden (Abbildung 44), dass beide Mek Kinasen eine Rolle in der Proliferationsregulation spielen. Die Inhibition der Mek2 Isoform hat einen schnelleren und wesentlich stärkeren Effekt auf das Wachstum als die Hemmung von Mek1 (Abbildung 36, Abbildung 37, Abbildung 38). Die beiden Mek Isoformen scheinen also über unterschiedliche Mechanismen auf die Proliferation der Ras-transformierten Zellen zu wirken. Einen weiteren Hinweis auf eine unterschiedliche Wirkungsweise der beiden Mek Isoformen lieferte die Analyse von Zielproteinen der beiden Kinasen. Entgegen früheren Daten {Jelinek, 1994 #104} hat die Ausschaltung der Mek2 Isoform einen stärkeren Einfluss auf die im Nukleus befindliche Menge an aktivem Erk1 und Erk2. Trotz einer über 48 Stunden anhaltenden Inhibition der beiden Mek Isoformen konnte immer noch eine Restmenge an aktivem Erk1/2 nachgewiesen werden. Möglicherweise kommt es über einen Mek-unabhängigen Weg zur Erk Aktivierung.

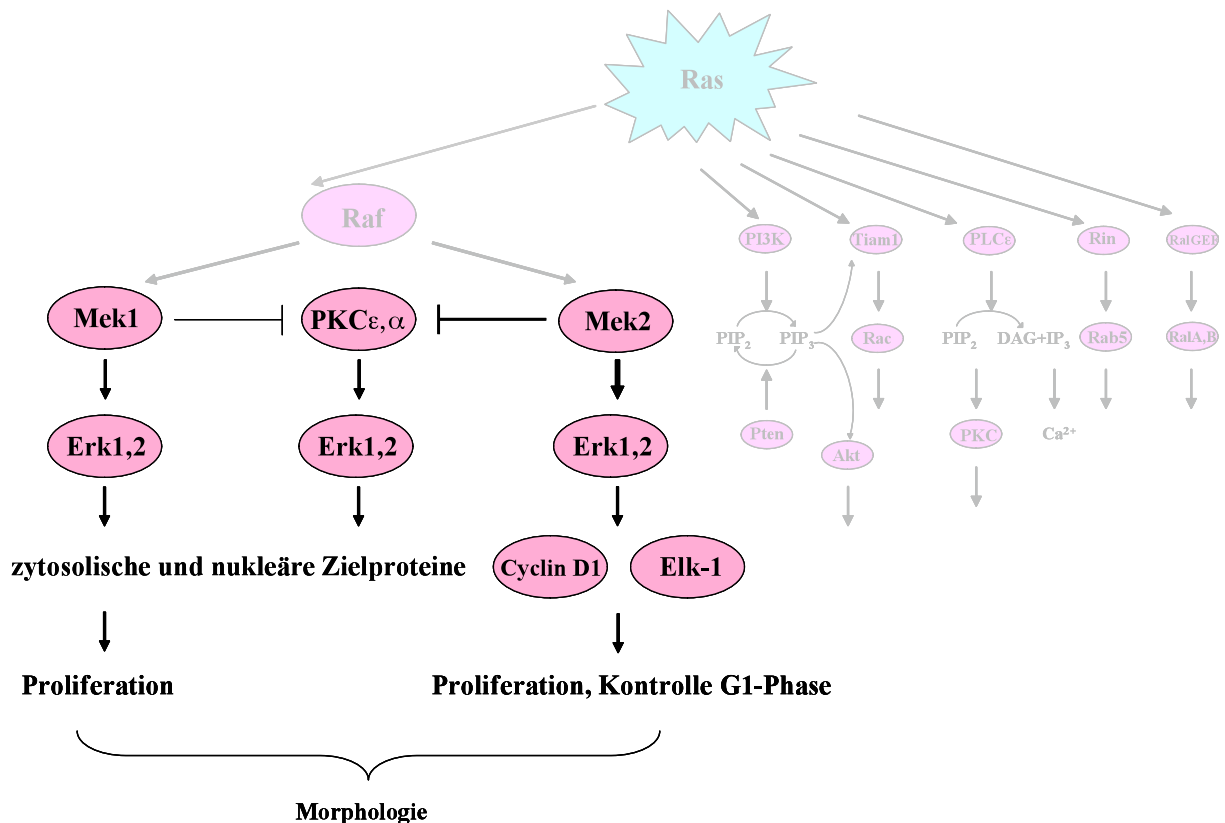


Abbildung 44: Zusammenfassende Darstellung der Funktion von Mek1 und Mek2 in Ras-transformierten NIH3T3-pEJ Zellen.

Passend zu dem starken Einfluss auf die Proliferation resultiert die Inhibition von Mek2 in einer starken Reduktion der Cyclin D1 Expression, während Mek1 keinen Effekt zeigt. Bezüglich des Einflusses der beiden Mek Kinasen auf die Proliferation konnte kein synergistischer Effekt beobachtet werden. Erst die gleichzeitige Ausschaltung beider Isoformen führt zu einer Reversion der morphologischen Transformation. Jede Isoform für sich hat nur einen geringen Einfluss auf die Morphologie der NIH3T3-pEJ Zellen.

3.4 Erk1 und Erk2 kontrollieren gemeinsam die Ausprägung des transformierten Phänotyps

3.4.1 Die effiziente Inhibition der Erk1 und Erk2 Kinasen durch RNA Interferenz

Aktiviertes Mek1 und Mek2 phosphoryliert die beiden Substratkinasen Erk1 und Erk2. Bisher konnten keine weiteren Substrate für die beiden Mek Isoformen charakterisiert werden. Für Erk

Kinasen stehen keine pharmakologischen Inhibitoren zur Verfügung. Die hohe Homologie von Erk1 und Erk2 von 85% würde außerdem eine effiziente, isoform-spezifische Hemmung kaum erlauben. Mit der RNA Interferenz steht jedoch eine Methode zur Verfügung, die eine Unterscheidung auch stark homologer Sequenzen ermöglicht und somit eine isoformspezifische Inhibition ermöglicht.

siRNA Duplexe, die spezifisch gegen Erk1 bzw. Erk2 gerichtet waren, wurden in NIH3T3-pEJ Zellen mittels Lipofektion transfiziert. Die Western Blot Analyse zeigte, dass in den NIH3T3-pEJ Zellen mehr phosphoryliertes Erk2 als Erk1 vorliegt (Abbildung 45).

Die Inhibition der Erk1 Expression ist sehr effizient. Bereits 8 Stunden nach der zweiten Transfektion ist nur noch ein sehr schwaches Erk1 spezifisches Signal auf dem Western Blot zu erkennen. 28, 52 und 76 Stunden nach der zweiten Transfektion ist Erk1 dann nicht mehr nachweisbar. Im Gegensatz dazu resultiert die Transfektion der Erk2 spezifischen siRNA 8 Stunden nach der zweiten Transfektion nur in einer ca. 50%igen Reduktion der Erk2 Expression. 28 Stunden nach der zweiten Transfektion ist dagegen noch eine schwache Erk2 spezifische Bande zu erkennen, und erst 52 Stunden nach der Transfektion ist Erk2 unter der Nachweisgrenze (Abbildung 45). Interessanterweise führt die Inhibition von Erk2 nach 8 und 28 Stunden zu einer verstärkten Aktivierung der Erk1 Isoform, zu erkennen an dem verstärkten Signal an phospho-Erk1.

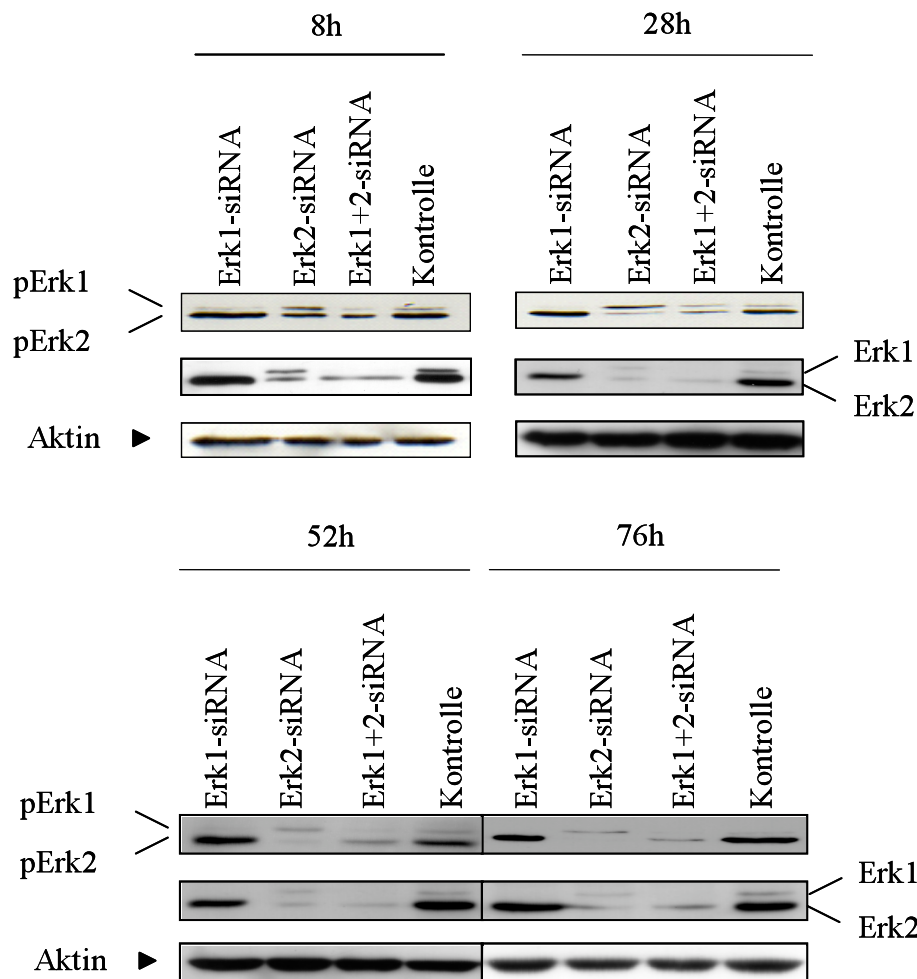


Abbildung 45: Western Blot Analyse der Erk1 und Erk2 Expression nach Transfektion isoform-spezifischer siRNAs. Gesamtextrakte wurden 8, 28, 52 und 76 Stunden nach der zweiten Transfektion von NIH3T3-pEJ präpariert. Es wurde sowohl phosphoryliertes Erk1/2 als auch Gesamt-Erk1/2 nachgewiesen. Ein aktinspezifischer Antikörper diente als Ladungskontrolle.

Auch für die beiden Erk-Isoformen wurden zur Kontrolle der Spezifität der siRNA Duplexe zusätzliche siRNAs hergestellt. Auch die Transfektion der neuen siRNA Duplexe resultiert in einem fast vollständigen Verlust der jeweiligen Isoform (Abbildung 46). Das Erk1-Protein ist 28 Stunden nach der zweiten Transfektion mittels Westernblot Analyse nicht mehr nachweisbar, allerdings scheint der Erk1-1 Duplex auch die Erk2 Expression zu supprimieren. Dieses deutet auf einen möglichen unspezifischen Effekt hin, der in den folgenden Experimenten jedoch nicht bestätigt werden konnte. Die Transfektion von Erk2-spezifischen siRNAs führt erst 52 Stunden nach der zweiten Transfektion zu einer fast vollständigen Suppression der Erk2 Expression (Abbildung

46). Dabei weist der Erk2-2-Duplex eine höhere Effizienz als der Erk 2-1 Duplex auf und wurde in den weiteren Experimenten benutzt.

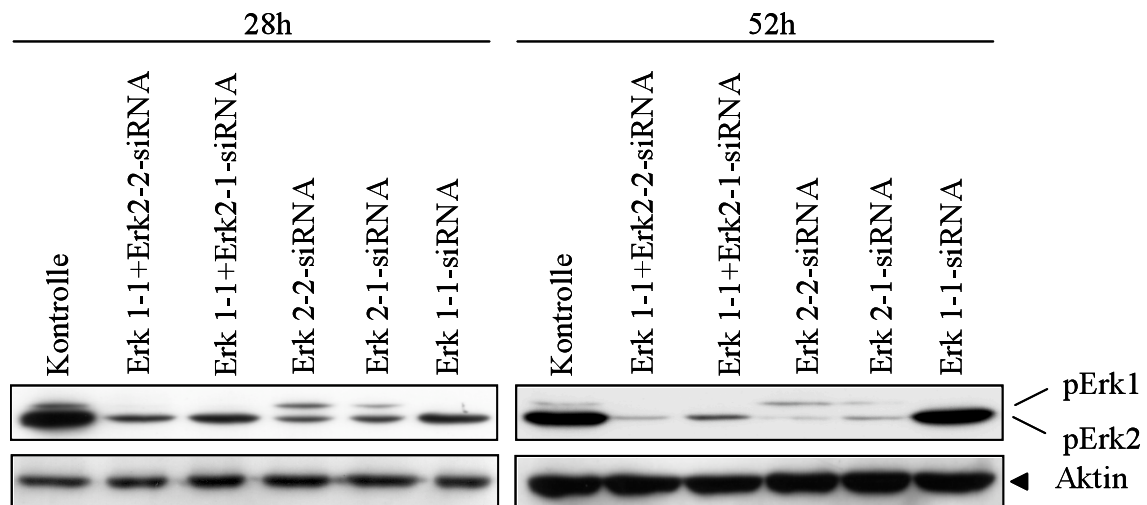


Abbildung 46: Westernblot Analyse der phospho-Erk1/2 Expression nach der Transfektion von NIH3T3-pEJ Zellen mit den siRNA Duplexen Erk1-1, Erk2-1, Erk2-2. Die Gesamtextrakte wurden zu den angegebenen Zeitpunkten nach der zweiten Transfektion isoliert und mit einer Kontrolltransfizierten Probe verglichen. Um eine gleichmäßige Beladung der Proben zu gewährleisten, wurde ein aktinspezifischer Antikörper benutzt.

3.4.2 Isoform-spezifische Funktionen von Erk1 und Erk2 in der Kontrolle des Zellwachstums

Die Applikation der beiden Erk1-spezifischen siRNAs resultiert in einer 40%igen Zellzahlreduktion (Abbildung 47). Der mögliche, unspezifische Effekt der siRNA Erk1-1 wirkt sich somit nicht auf das Wachstum der NIH3T3-pEJ Zellen aus. Die Erk2 Isoform hat einen geringen Einfluss auf die Proliferation. Die Zellzahl ist um 20 bzw. 15% reduziert (Abbildung 47). Bezüglich der Proliferation zeigen die beiden Erk Kinasen keinen additiven Effekt.

Betrachtet man nun das Wachstum in einem Zeitraum von 48-96 Stunden nach der zweiten Transfektion, so resultiert die Hemmung beider Erk Isoformen in einer starken Reduktion der Proliferation (Abbildung 48). Ein additiver Effekt der simultanen Hemmung beider Kinasen konnte jedoch auch hier nicht festgestellt werden.

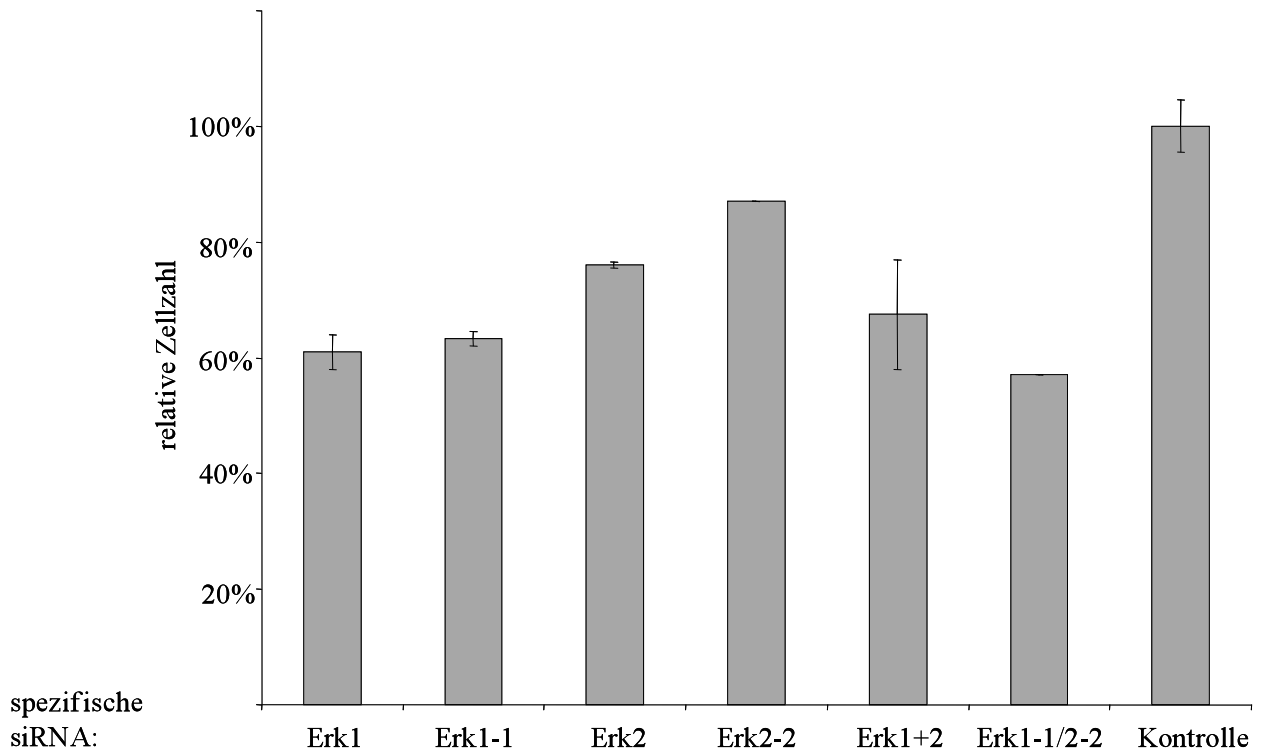


Abbildung 47: Graphische Darstellung der relativen Zellzahl 48 Stunden nach der Transfektion Erk1 und Erk2 spezifischer siRNA Duplexe. Die Probe mit der höchsten Zellzahl wurde gleich 100% gesetzt und die anderen dazu in Relation gebracht. Die Werte ergeben sich aus drei unabhängigen Experimenten.

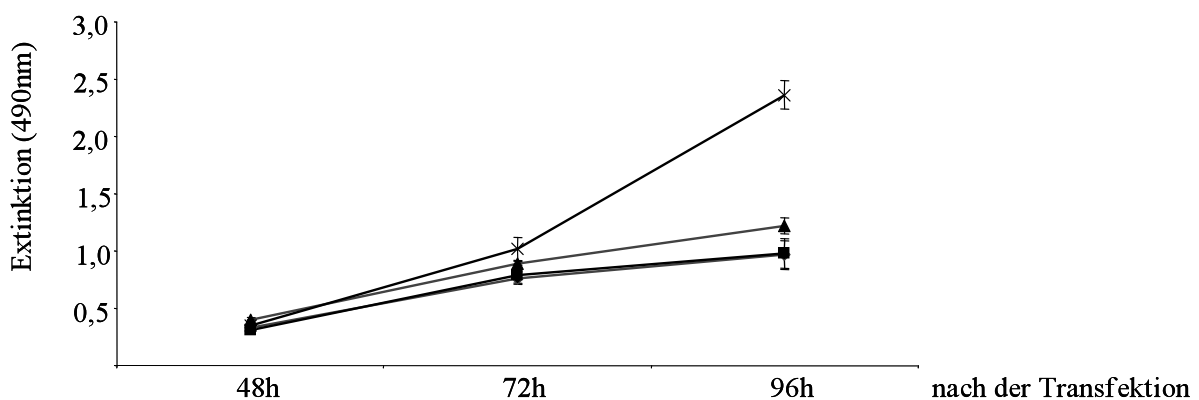


Abbildung 48: Anker-abhängiges Wachstum von NIH3T3-pEJ Zellen nach Transfektion von siRNA Duplexen spezifisch gegen Erk1 (Raute), Erk2 (Dreieck), Erk1+2 (Rechteck) und von Kontrollzellen (Kreuz).

3.4.3 Das verankerungsunabhängige Wachstum der HRAS-transformierten Zellen basiert auf der Aktivität beider Erk Kinasen

Wie schon beim 2-dimensionalen Wachstum beobachtet (Abbildung 48), wird auch das 3-dimensionale Wachstum durch die Ausschaltung beider Erk Isoformen stark beeinflusst (Abbildung 49). Ist zwischen 48 und 72 Stunden noch eine leichte Proliferation in den siRNA behandelten Proben zu erkennen, so zeigen die Zellen zwischen 72 und 96 Stunden kein Wachstum mehr. Die Proliferationskurve der NIH3T3-pEJ Zellen, die sowohl mit Erk1 als auch mit Erk2 spezifischen siRNA Duplexen behandelt wurden, verläuft genauso wie die Kurven, der nur mit Erk1 oder Erk2 siRNA behandelten Zellen (Abbildung 49). Beide Erk Kinasen besitzen somit eine vollständige Wachstumskontrolle.

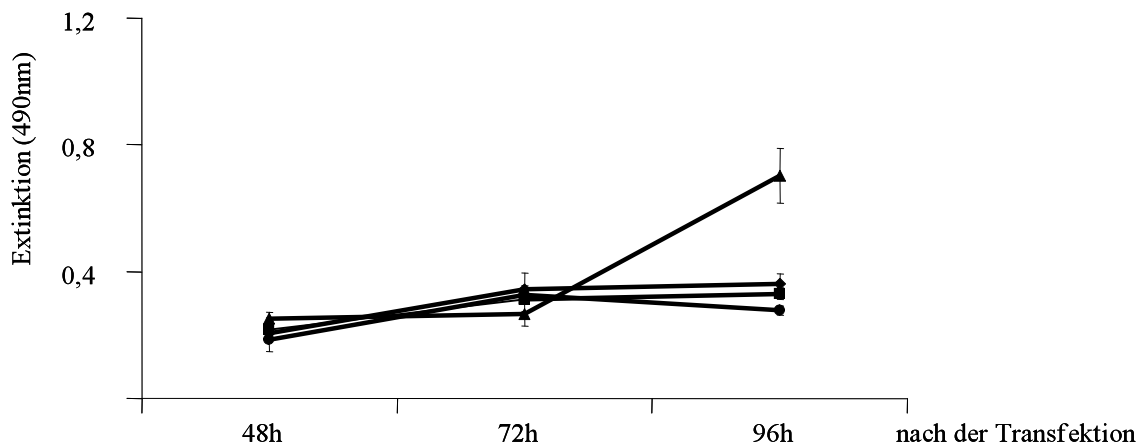


Abbildung 49: Verankerungsunabhängiges Wachstum von NIH3T3-pEJ Zellen 48 bis 96 Stunden nach der zweiten Transfektion von siRNA Duplexen spezifisch gegen Erk1 (Raute), Erk2 (Rechteck), Erk1+2 (Kreis) und von mit Oligofectamine transfizierten Zellen (Dreieck). Die Zellen wurden zweimal in einem Abstand von 24 Stunden mit den jeweiligen Duplexen transfiziert und 24 Stunden nach der zweiten Transfektion auf 96well Platten ausplattiert. Zu den angegebenen Zeitpunkten nach der 2. Transfektion wurde das Zellwachstum mittels eines XTT-Assays bestimmt.

3.4.4 Die Aktivität beider Erk Kinasen ist für die morphologische Transformation nötig

Während die Inhibition einer Erk Isoform ausreicht, um das verankerungsunabhängige Wachstum der NIH3T3-pEJ Zellen zu hemmen (Abbildung 49), ist der Einfluss der einzelnen Erk Isoformen

auf die Morphologie nur gering (Abbildung 50a, b). Nach der Transfektion mit Erk1 oder Erk2 spezifischen siRNA Duplexen zeigen die Zellen eine etwas abgeflachte Morphologie, revertieren aber nicht vollständig (Abbildung 50a, b). Im Gegensatz dazu resultiert die simultane Applikation von Erk1 und Erk2 spezifischen siRNA Duplexen in einer vollständigen Reversion des transformierten Phänotyps (Abbildung 50c). Die Morphologie dieser Zellen entspricht dem Phänotyp der nicht transformierten NIH3T3 Zelllinie (Abbildung 50e).

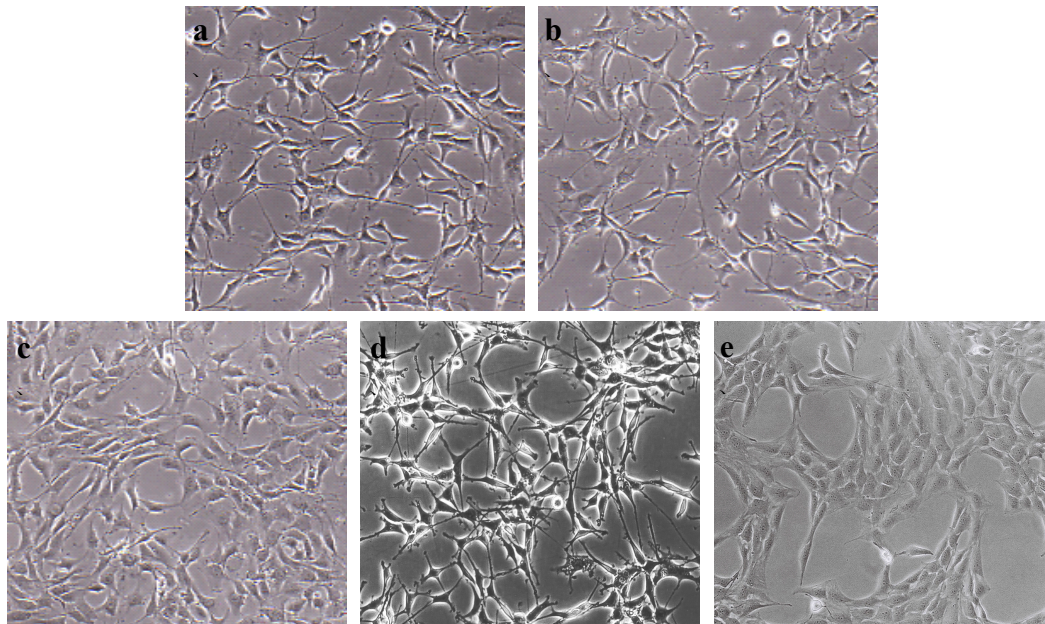


Abbildung 50: Morphologie der NIH3T3-pEJ Zellen 48 Stunden nach der zweiten Transfektion mit siRNA Duplexen spezifisch gegen Erk1 (a), Erk2 (b) oder Erk1+2 (c) oder von Kontrollzellen (d). Zum Vergleich wurde auch ein Bild der untransformierten NIH3T3 Zellen (e) hinzugefügt.

3.4.5 Der Einfluss der beiden Erk Kinasen auf die Expression verschiedener Zielproteine

Die beschriebenen Daten zu den beiden Erk Kinasen haben gezeigt, dass die Inhibition einer Kinase zur Hemmung des verankerungsunabhängigen Wachstums ausreicht (Abbildung 49). Die Ausprägung der transformierten Morphologie benötigt dagegen die Aktivität beider Erk Isoformen (Abbildung 50). Um die möglichen molekularen Ursachen dieses Unterschiedes zu erkennen, wurden die Auswirkungen der drei siRNA-Behandlungen auf die Expression von Zellzyklusregulatoren wie Cyclin D1 und auf die Aktivität von potentiellen Signalproteinen wie PKC und NFκB analysiert (Abbildung 51). Die beiden Erk Isoformen translozieren kurz nach ihrer Aktivierung in den Zellkern und steuern dort durch die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren die Expression

einer Vielzahl von Genen. Einer dieser durch Erk1/2 regulierten Transkriptionsfaktoren ist Elk-1. Die Applikation von Erk1 spezifischen siRNA Duplexen führt zu einem vollständigen Verlust an aktivem Elk1, während 48 Stunden nach der zweiten Transfektion in den mit Erk2 siRNA behandelten Zellen ein Rest an aktivem Elk1 vorhanden ist (Abbildung 51). Anders verhält es sich dagegen bei der Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFκB. Die Inhibition der Erk2 Isoform resultiert in einer starken Aktivierung des p65 NFκB. Die Erk1 Inhibition hat dagegen nur einen sehr geringen Einfluss auf die Phosphorylierung von p65-NFκB. In den Kontrollzellen konnte aktives p65-NFκB nicht nachgewiesen werden.

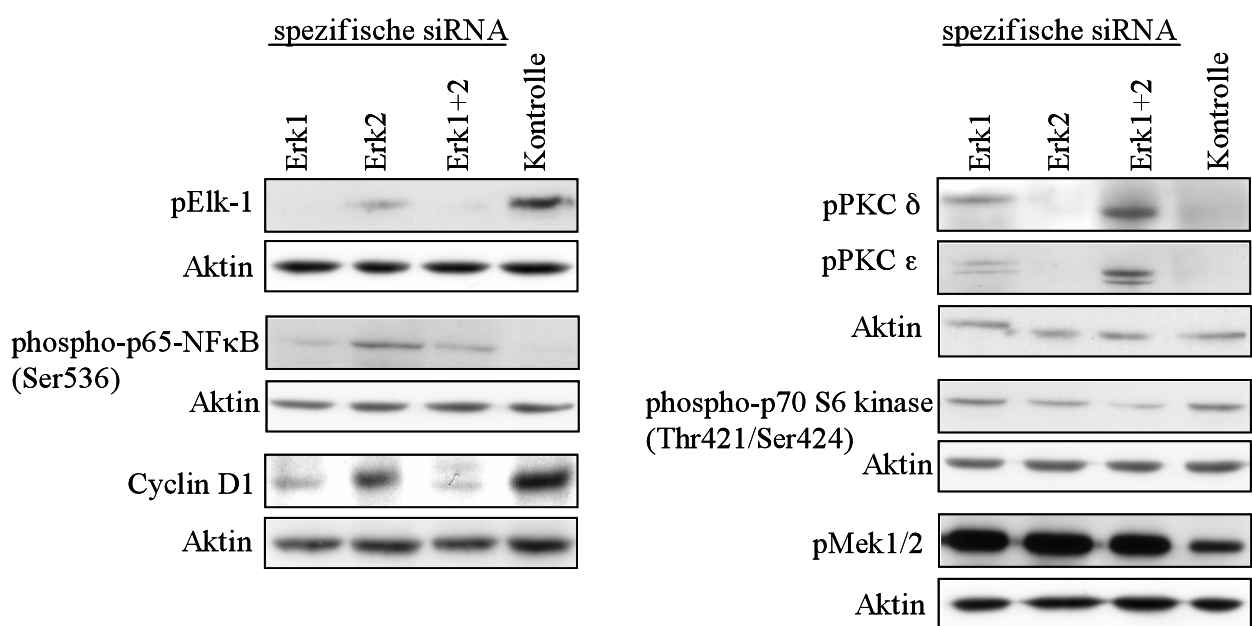


Abbildung 51: Einfluss der beiden Erk Isoformen auf die Expression verschiedener, potentieller Zielproteine. NIH3T3-pEJ Zellen wurden zweimal im Abstand von 24 Stunden mit siRNA Duplexen spezifisch gegen Erk1, Erk2 oder Erk1+2 transfiziert und 48 Stunden nach der zweiten Transfektion Gesamtproteine präpariert. Mittels Western Blot Analyse wurde die Expression von phospho-Elk1, Cyclin D1, phospho-PKC delta (δ) und epsilon (ε), phospho-Mek1/2, phospho-p70 S6 Kinase und phospho-p65-NFκB untersucht. Als Ladungskontrolle diente ein aktinspezifischer Antikörper.

Da die Inhibition beider Erk Isoformen einen gleichstarken Einfluss auf die Proliferation der NIH3T3-pEJ Zellen hat, wurde die Cyclin D1 Expression in den transfizierten Zellen untersucht. Auf die Expression von Cyclin D1 hat die Erk1 Isoform einen sehr viel größeren Einfluss als

Erk2. So führt die Inhibition von Erk1 zu einer fast vollständigen Hemmung der Expression von Cyclin D1, dagegen zeigt die Erk2 siRNA nur einen geringen Effekt auf die Menge an Cyclin D1 (Abbildung 51).

Auch in dem Einfluss auf die Aktivierung von potentiellen Signalproteinen unterscheiden sich die beiden Erk Isoformen. Die Inhibition von Erk1 resultiert in einer leichten Aktivierung der PKC Isoformen delta (δ) und epsilon (ϵ), die Hemmung von Erk2 zeigt dagegen keinen Effekt (Abbildung 51). Erst die simultane Ausschaltung beider Erk Isoformen führt zu einer starken Aktivierung der beiden PKC Isoformen. Auch auf die Aktivierung der p70 S6 Kinase hat die gleichzeitige Inhibition beider Erk Kinasen den größten Effekt (Abbildung 51). Die Hemmung von Erk2 resultiert dagegen in einer leichten Reduktion an aktivierter p70 S6 Kinase. Die Inhibition von Erk1 zeigt keinen Effekt.

Interessanterweise induziert die Inhibition von Erk1 oder Erk2 oder beider Erk Isoformen gleichzeitig eine verstärkte Aktivierung von Mek1 und Mek2 (Abbildung 51). Möglicherweise wird durch die Hemmung der beiden Erk Kinasen ein negativer Rückkoppelungsmechanismus zu den beiden Mek Kinasen ausgeschaltet.

Anders verhält es sich dagegen bei der Regulation der p70 S6 Kinase und der Aktivierung des Transkriptionsfaktors p65-NF κ B. So hat Erk1 keinen Effekt auf die Expression der p70 S6 Kinase, wogegen die Erk2 Inhibition zu einer leichten Verminderung an aktivierter p70 S6 Kinase führt. Dieser Effekt wird verstärkt wenn beide Isoformen mittels RNA Interferenz ausgeschaltet werden.

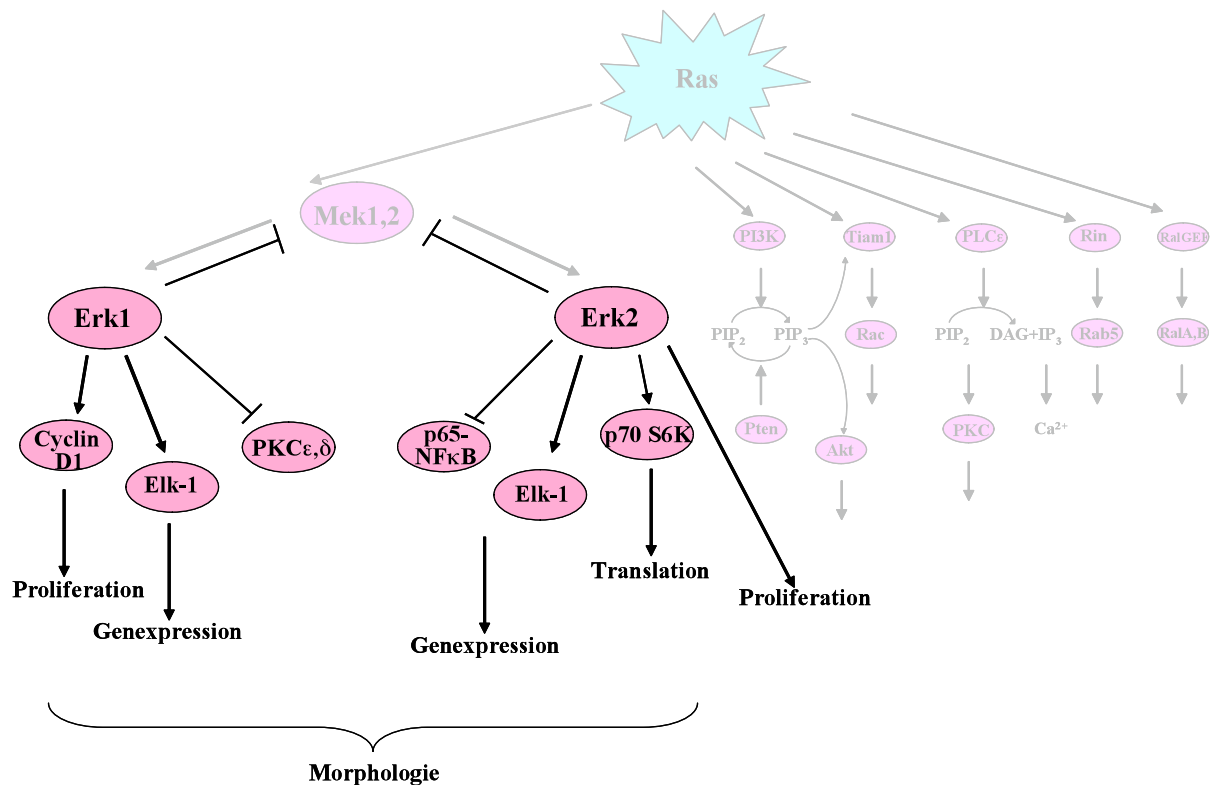


Abbildung 52: Zusammenfassende Darstellung der Wirkungsweise von Erk1 und Erk2 in den Ras-transformierten NIH3T3-pEJ Zellen. Die Dicke der Pfeile gibt die Stärke der Aktivierung an.

Beide Erk Kinasen sind für die Proliferation der NIH3T3-pEJ Zellen von elementarer Bedeutung (Abbildung 52). Der Verlust der einen Isoform kann nicht durch die andere kompensiert werden. Dagegen reicht die Inhibition nur einer Isoform nicht aus, um die Morphologie der Zellen zu verändern. Erst die gleichzeitige Ausschaltung der beiden Erk Kinasen führt zur vollständigen Reversion des transformierten Phänotyps (Abbildung 52). Bei dem Einfluss der beiden Erk Isoformen auf den transformierten Phänotypen konnten keine Unterschiede festgestellt werden. Allerdings scheint der Mechanismus über den die beiden Erk Kinasen auf die Proliferation der Zellen Einfluss nehmen, wie schon bei den beiden Mek Isoformen unterschiedlich zu sein. Nur die Hemmung von Erk1 resultiert in einem fast vollständigen Verlust der Cyclin D1 Expression, während die Inhibition der Erk2 Isoform nur einen geringeren Effekt zeigt. Auch bei der Regulation weiterer, potentieller Zielproteine konnten isoformspezifische Unterschiede beobachtet werden. Interessanterweise resultiert die Hemmung von Erk1 und/ oder Erk2 in einer verstärkten Aktivierung von Mek1 und Mek2. Möglicherweise regulieren die beiden Erk Isoformen über einen negativen Rückkoppelungsmechanismus die Aktivität ihrer beiden Effektorkinasen (Abbildung 52).

3.5 Untersuchung einer möglichen Interferon-Antwort durch die Transfektion von siRNA Duplexen in NIH3T3-pEJ Zellen

3.5.1 Die Transfektion des Polymers PolyIC führt zur Induktion einer Interferon-Antwort

Die Anwendung von langen, doppelsträngigen RNA Molekülen zur sequenzspezifischen Ausschaltung bestimmter Gene scheiterte in Säugetierzellen daran, dass durch die langen RNA Moleküle eine sequenzunabhängige Interferon Antwort ausgelöst wurde {Elbashir, 2001 #58}. Tuschl und seine Mitarbeiter fanden im Jahre 2001 heraus, dass diese Interferon-induzierte Antwort nicht ausgelöst wird, wenn die Länge der doppelsträngigen RNA auf unter 30 Basenpaare reduziert ist. Neuere Arbeiten konnten allerdings zeigen, dass auch die Transfektion der kleinen siRNA Duplexe in bestimmten Zellen eine Interferon Antwort auslösen kann {Sledz, 2003 #229}. Ein wichtiger, dafür verantwortlicher Faktor ist die Proteinkinase R (PKR) {Stark, 1998 #236}. PKR wird normalerweise durch Interferon oder lange virale dsRNA aktiviert. Diese Aktivierung resultiert in der Phosphorylierung und Inaktivierung des Translationsfaktors eIF2 α . Die Inaktivierung von eIF2 α seinerseits führt zur Repression der Translation. In der Folge gehen die Zellen entweder in die Apoptose oder in einen Zellzyklusarrest über. Neben PKR wird auch die 3'-5' Oligoadenylatesynthase aktiviert, die wiederum die RNaseL aktiviert und somit zu einer Degradation der mRNA führt {Stark, 1998 #236}. Interferone können darüber hinaus noch andere Signaltransduktionswege aktivieren, in denen die Tyrosinkinasen Tyk2 und Jak1, die Transkriptionsaktivatoren Stat1 und Stat2 und der Transkriptionsfaktor IRF9 eine Rolle spielen. Diese Signalkaskaden gipfeln in der Induktion einer Vielzahl von Interferon-stimulierten Genen (ISGs), deren Funktionen nicht vollständig aufgeklärt sind {Haque, 1998 #86} {Stark, 1998 #236}.

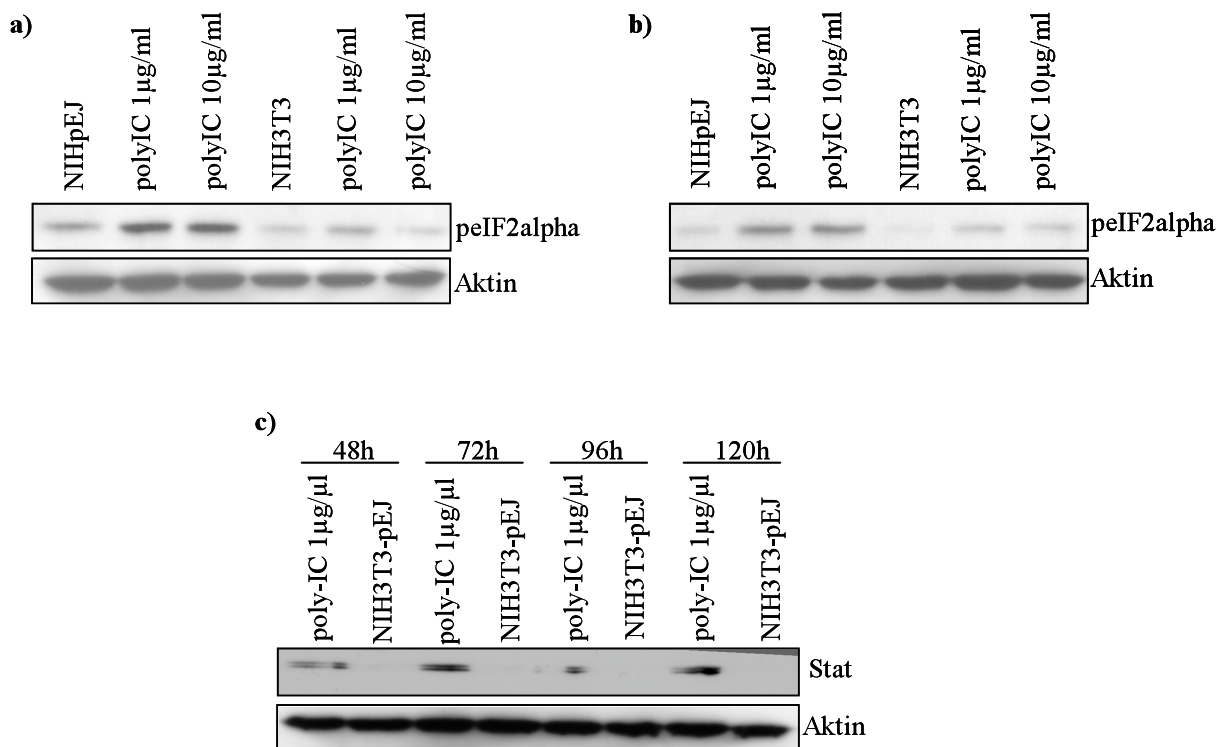


Abbildung 53: Western Blot Analyse der Expression von pEIF2α 1 Stunde (a) und 2 Stunden (b) nach der Transfektion des Polymers PolyIC in NIH3T3-pEJ und NIH3T3 Zellen. Gesamtproteine für die Untersuchung der Stat1 Expression (c) wurden zu den angegebenen Zeitpunkten nach der Transfektion isoliert. Als Ladungskontrolle diente ein aktinspezifischer Antikörper.

Um sicher zu gehen, dass die in dieser Arbeit beobachteten Effekte nicht auf eine durch das PKR System induzierte Hemmung der Translation zurückzuführen sind, wurde die Aktivierung von Stat1, PKR und eIF2α nach der Transfektion mit verschiedenen siRNA Duplexen untersucht. Dafür wurden die Zellen zunächst mit einer Positivkontrolle behandelt, um zu sehen, ob in den NIH3T3-pEJ Zellen der PKR-Signaltransduktionsweg als Antwort auf dsRNA angeschaltet wird. Poly-IC ist ein Polymer bestehend aus Poly (I) und Poly (C) mit einer ungefähren Länge von 100-300 Basenpaaren. Es wurde als sehr effizient in der Induktion einer Interferon-Antwort beschrieben.

Die Transfektion von NIH3T3-pEJ Zellen mit polyIC führt 1 Stunde nach der Transfektion zu einer verstärkten Phosphorylierung des Translationsfaktors eIF2α (Abbildung 53a), die auch noch 2 Stunden nach der Transfektion zu beobachten ist (Abbildung 53b). Auch in den NIH3T3 Zellen ruft die Transfektion von polyIC eine erhöhte Phosphorylierung des eIF2α Proteins hervor, allerdings in einem wesentlich geringeren Ausmaß als in den NIH3T3-pEJ Zellen (Abbildung 53a, b).

Die Phosphorylierung von Stat1 geht dagegen mit einer wesentlich langsameren Kinetik vonstatten. So konnte erst 48 Stunden nach der Applikation von polyIC eine Induktion der Stat1 Expression festgestellt werden (Abbildung 53c). Diese hält dafür über einen Zeitraum von mehr als 72 Stunden an (Abbildung 53c). Die NIH3T3-pEJ reagieren also auf die Behandlung mit dem Interferon induzierenden polyIC mit der Anschaltung des PKR Signaltransduktionsweges.

3.5.2 Die Transfektion von siRNA Duplexen in NIH3T3-pEJ Zellen löst keine Interferon-Antwort aus

Um auszuschließen, dass die beschriebenen durch siRNA Transfektion beobachteten Effekte insbesondere die Hemmung der Proliferation auf die Induktion einer Interferon Antwort zurückzuführen sind, wurden die Zellen mit verschiedenen siRNA Duplexen transfiziert und die Menge an phosphoryliertem PKR, eIF2 α und Stat1 untersucht (Abbildung 54).

Die Western Blot Analyse zeigt, dass die Transfektion keiner der verwendeten siRNA Duplexe zu einer verstärkten Phosphorylierung des Translationsfaktors eIF2 α im Vergleich zu den Kontroll-transfizierten NIH3T3-pEJ führt (Abbildung 54a). Auch die Aktivierung der Proteinkinase R und Stat1 ändert sich nach Zugabe von siRNA Duplexen zum Transfektionsansatz nicht (Abbildung 54b, c). Die beschriebenen Effekte nach Inhibition verschiedener Komponenten des Raf-Mek-Erk Signaltransduktionsweges sind daher mit hoher Wahrscheinlichkeit spezifisch und werden nicht durch die Anschaltung des PKR Systems hervorgerufen.

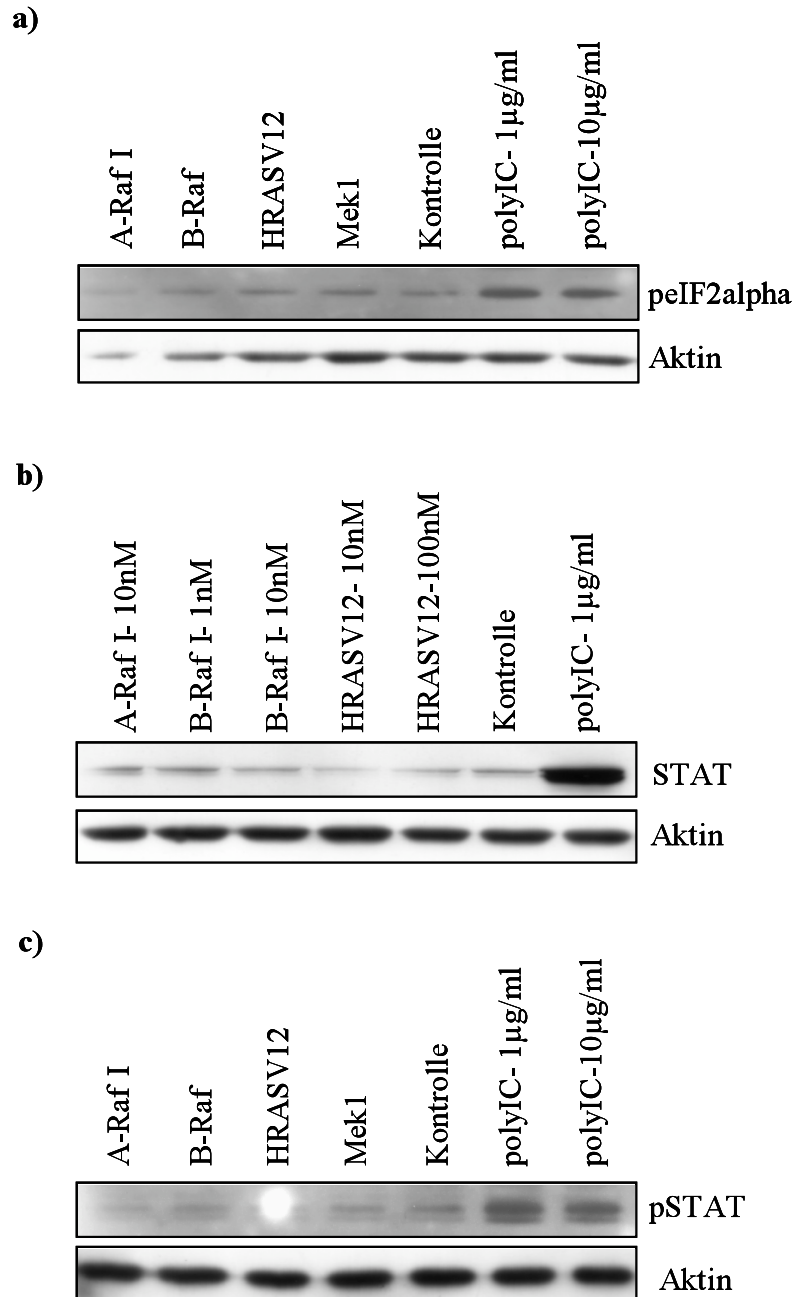


Abbildung 54: Western Blot Analyse der Phosphorylierung von eIF2 α (a) und Stat 1 (c) nach Transfektion von siRNA Duplexen spezifisch gegen A-Raf, B-Raf, HRAS-V12 und Mek1 und nach Kontrolltransfektion. Zusätzlich wurde noch die Expression des gesamten Stat1 untersucht (b). Als Positivkontrolle wurde die Transfektion von polyIC verwendet. Um eine gleichmäßige Beladung der Westernblots zu gewährleisten, wurde ein aktinspezifischer Antikörper benutzt.

3.6 Einfluss der unterschiedlichen Komponenten des Raf-Mek-Erk-Signaltransduktionsweges auf die Expression Ras-regulierter Gene

Für eine weitreichende Analyse der Genexpressionsveränderungen durch RAS Onkogene wurden in der Arbeitsgruppe von verschiedenen immortalen und HRAS oder KRAS transformierten Maus- und Rattenfibroblasten sowie Ovarialepithelzellen subtraktive cDNA Banken hergestellt und analysiert {Zuber, 2000 #291} {Tchernitsa, 2004 #244}. Die erste genomweite Analyse Ras-abhängiger Gene erfolgte in immortalisierten Rattenfibroblasten (208F) und einem HRAS-transformierten Derivat (FE-8) {Zuber, 2000 #291}. Dabei konnten 244 Gene mit bekannter Funktion, 104 exprimierte Sequenzen ohne bekannte Funktion (ESTs) und 45 potentiell neue Gene als Onkogen-abhängig identifiziert werden {Zuber, 2000 #291}. Auch für die epitheliale Rattenovarialzelllinie Rose 199 und deren KRAS-transformiertes Derivat (Rose 199-A2/5) konnte ein umfassender Katalog Onkogen-abhängiger, differentiell exprimierter Gene erstellt werden {Tchernitsa, 2004 #244}. Unter den differentiell exprimierten Sequenzen befanden sich 192 Gene mit bekannter Funktion, 140 ESTs und 35 potentiell neue Gene {Tchernitsa, 2004 #244}.

Um die differentielle Expression vieler Gene in den jeweiligen Zellpaaren verifizieren und weiter analysieren zu können, wurden im Labor für funktionelle Genomanalyse der Charité verschiedene cDNA Microarrays mit bis zu 300 Genen hergestellt und mit Proben aus den Zellen hybridisiert.

251 differentiell exprimierte Gene einer Genbank aus immortalen und HRAS-transformierten NIH3T3 Zellen wurden auf einem Maus-RAS Chip zusammengefasst und für die weiteren Experimente verwendet. Von besonderem Interesse war dabei, die möglichen isoformspezifischen Unterschiede zwischen den beiden Mek und den beiden Erk Kinasen auf Ebene der Genexpression zu untersuchen. Aber auch die gleichzeitige Ausschaltung der beiden Mek und der beiden Erk Kinasen zeigt mit der Reversion der Transformation einen interessanten Phänotyp, der in Hinsicht auf die Modulation der Genexpression untersucht werden sollte.

3.6.1 Die simultane Hemmung von Mek1 und Mek2 oder Erk1 und Erk2 hat den größten Einfluss auf das Genexpressionsprofil in den NIH3T3-pEJ Zellen

NIH3T3-pEJ Zellen wurden wie in allen bisherigen Experimenten zweimal im Abstand von 24 Stunden mit siRNA Duplexen spezifisch gegen HRAS-V12, HRAS-WT, A-Raf, Mek1, Mek2, Erk1, Erk2 und EGFP transfiziert. 48 Stunden nach der zweiten Transfektion wurde die RNA isoliert und gegen den Mikroarray hybridisiert. Dabei wurden zwei Arrays mit jeder Probe hybridi-

siert und dabei die Markierung der Proben mit dem Fluoreszenz-Farbstoffen Cy3 und Cy5 vertauscht. Die Auswertungen der Mikroarrays erfolgten mit den Programmen ImaGene und GeneSight der Firma Biodiscovery und wurden von Oleg Tchernitsa (AG Schäfer, LFGC, Charité) durchgeführt. Dabei wurden zunächst für jedes Gen die Intensitäten der sechs auf dem Array gespoteten Replika bestimmt, sowohl für Cy3 als auch für Cy5 und der Mittelwert daraus gebildet. Die Normalisierung der Daten erfolgte über die Intensität des gesamten Arrays. Für jedes Gen wurde das Verhältnis zwischen dem Mittelwert der Intensitäten der Kontrollen und dem Mittelwert der Intensitäten für die siRNA-behandelten NIH3T3-pEJ gebildet. Die statistische Auswertung der Arrays erfolgte mit dem Programm SAM (Stanford University). Es wurden die Gene als differentiell eingestuft, deren Expression durch die RNAi Behandlung oder die Applikation der Inhibitoren gegenüber den Kontrollen 1,7fach verstärkt oder 2fach supprimiert war (Tabelle 2). Die FDR (false discovery rate) in der Analyse beträgt für alle Subgruppen 5%.

In den bisherigen Kapiteln konnte gezeigt werden, dass die Inhibition einzelner Komponenten des Raf-Mek-Erk-Signaltransduktionsweges einen starken Einfluss auf die Proliferation und Morphologie der Zellen hat. Aber in wieweit schlägt sich das auf das Genexpressionsprofil der Zellen nieder? Zunächst lässt sich feststellen, dass die Behandlungen, die zur Reversion des transformierten Phänotyps führen, den größten Einfluss auf die Expression der Ras-Zielgene haben (Tabelle 2). Die simultane Hemmung der beiden Erk Kinasen durch siRNAs resultiert in einer Aktivierung von 28 Genen und einer Suppression von 43 Genen. 48 Stunden nach der gleichzeitigen siRNA-vermittelten Inhibition beider Mek Kinasen zeigen 24 Gene eine verstärkte Expression und 40 eine verminderte Expression. Da die Hemmung der beiden Mek Kinasen erst 72 Stunden nach der zweiten Transfektion zu einer Reversion der transformierten Morphologie führt, wurde auch zu diesem Zeitpunkt das Genexpressionsprofil untersucht. Die Zahl der differentiell exprimierten Gene ist gegenüber der 48 Stunden Probe erhöht. 26 Gene sind aktiviert und 57 Gene zeigen eine verminderte Expression (Tabelle 2). Neben der siRNA-vermittelten Hemmung des Raf-Mek-Erk-Signaltransduktionsweges wurde auch ein pharmakologischer Mek-Inhibitor verwendet (diese Arbeiten wurden von Oleg Tchernitsa durchgeführt). Die Applikation des Mek1/2 Inhibitors U0126 resultiert nach 48 Stunden in einer Reversion der transformierten Morphologie (Daten nicht gezeigt). 6 Stunden nach Zugabe des Inhibitors zu den NIH3T3-pEJ Zellen konnte der stärkste Einfluss auf die Aktivierung von Erk1/2 beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Zu beiden Zeitpunkten wurde das Genexpressionsprofil untersucht. U0126 hat von allen Behandlungen den stärksten Einfluss auf das Genexpressionsprofil (Tabelle 2). Insgesamt werden 87 bzw. 90 Gene in ihrer Expression reguliert.

Etwas überraschend ist der geringe Einfluss der HRAS-V12 Hemmung auf das Genexpressionsprofil. Trotz der leichten Reversion der transformierten Morphologie und des starken Einflusses auf die Proliferation, führt die Inhibition des Onkogens zur Suppression von 30 Genen und nur 17 Gene werden in ihrer Expression aktiviert (Tabelle 2). Der Einfluss des HRAS- WT siRNA Duplexes ist gegenüber der HRAS-V12 siRNA leicht vermindert (Tabelle 2). Die Übereinstimmung in den aktivierten bzw. supprimierten Genen, die durch beide Duplexe in gleicher Weise reguliert werden, beträgt 76% bzw. 87% (Tabelle 3). Um mögliche unspezifische Effekte, die durch die Transfektion von siRNA Duplexen hervorgerufen werden zu analysieren, wurde eine siRNA benutzt, die zu keiner endogen exprimierten RNA eine Homologie aufwies. Dieser Duplex richtet sich gegen die mRNA des *enhanced green fluorescent protein (EGFP)*. Mit Hilfe einer BLAST Analyse wurde sichergestellt, dass die Homologie dieser siRNA zu den endogen exprimierten mRNAs nicht länger als 15 Nukleotide ist. Aus Tabelle 1 ist zu ersehen, dass die Transfektion der EGFP-Duplexe zu einer erhöhten Expression von 5 Genen führt und 10 Gene supprimiert. 7% der hier untersuchten Gene werden durch die Transfektion der EGFP-Duplexe in ihrer Expression beeinflusst. Um Gene ausschließen zu können, die bedingt durch den Stress der Transfektion unspezifisch reguliert werden, wurden Zellen der Transfektionsprozedur ohne siRNA unterworfen. 2% aller hier untersuchten Gene werden durch die Zugabe von Oligofectamine in ihrer Expression beeinflusst.

Wie in Kapitel 3.3 und 3.4 beschrieben, konnten zwischen den beiden Mek und Erk Kinasen isoformspezifische Unterschiede in Bezug auf die Regulation der Proliferation und der Aktivierung von potentiellen Zielproteinen beobachtet werden. Auch in ihrem Einfluss auf das Genexpressionsprofil unterscheiden sich Mek1 und Mek2 sowie Erk1 und Erk2 voneinander (Tabelle 2). Die Inhibition von Mek1 führt zu einer Aktivierung von 19 Genen und einer Suppression von 28 Genen. Einen stärkeren Einfluss als Mek1 hat die Mek2 Isoform. Hier zeigen 18 Gene eine verstärkte und 38 Gene eine verminderte Expression. Nur 50% der Gene, werden durch die Inhibition von Mek1 oder Mek2 in gleicher Weise reguliert (Tabelle 3). Deutlicher fällt der isoformspezifische Unterschied bei den beiden Erk Kinasen aus. Die Inhibition der Erk1 Isoform aktiviert die Expression von 15 Genen und hemmt 19 Gene in ihrer Expression (Tabelle 2). Dagegen werden durch die Hemmung von Erk2 30 Gene positiv und 24 Gene negativ in ihrer Expression beeinflusst. 43% der differentiell exprimierten Gene wurden durch beide Erk Isoformen in gleicher Weise reguliert (Tabelle 3). Durch die Verwendung der zusätzlichen siRNA Duplexe Mek1-1, Mek2-1, Erk1-1 und Erk2-2 konnten unspezifische Effekte der siRNAs teilweise ausgeschlossen werden. Die Genexpressionsprofile für die beiden Erk2 spezifischen siRNA Duplexe beispielsweise überlappen in 93% der aktivierten Gene und sogar in 96% der supprimierten Gene. Ähnlich gute

	3T3-pEJ	U0126-48h	U0126-6h	LY	Mek1	Mek1-1	Mek2	Mek2-1	Mek	Mek	Mek	Erk1	Erk2	Erk	Erk1-1	Erk2-2	Erk	HRAS	HRAS	A-Raf	EGFP	Kontrolle
Aufreguliert	67	42	38	8	19	14	18	14	24	26	22	15	30	28	20	26	31	17	15	7	5	1
Abreguliert	78	48	49	14	28	33	38	41	40	57	24	19	24	43	24	34	42	30	27	26	10	4
Nicht-differentiell	60	112	109	161	151	153	141	143	140	109	150	170	149	132	158	145	127	149	146	159	173	174
Kein Signal	22	25	33	44	29	27	30	29	23	35	31	23	24	24	25	22	27	31	39	35	39	48
Gesamt	227	227	227	227	227	227	227	227	227	227	227	227	227	227	227	227	227	227	227	227	227	227

Tabelle 2: Auswertung der einzelnen Array-Hybridisierungen. Für jede einzelne Probe ist die Zahl der Auf- und Abregulierten Gene, der nicht differentiellen Gene und der Gene, die auf dem Array kein auswertbares Signal gezeigt haben, aufgelistet. Die Zellen wurden zweimal im Abstand von 24h mit den jeweiligen siRNA Duplexen transfiziert und die RNA 48 Stunden nach der zweiten Transfektion isoliert. Wegen der kurzen Suppression des HRAS-Onkogens wurde bei den Behandlungen HRAS-V12 und HRAS-WT die RNA schon 24h nach der zweiten Transfektion isoliert. Für die Behandlung mit den beiden gegen die Mek Kinasen gerichteten siRNA Duplexe wurde zusätzlich zur 48 Stunden Probe auch 72 Stunden nach der zweiten Transfektion RNA präpariert. Die beiden Inhibitoren U0126 und LY294002 wurden dem Medium beigelegt und die RNA nach 48 Stunden präpariert. Da die U0126 Behandlung nach 6 Stunden den stärksten Effekt auf die Aktivierung der beiden Erk Kinasen zeigt, wurde zusätzlich auch zu diesem Zeitpunkt RNA isoliert.

Übereinstimmungen konnten für die beiden Mek2 siRNAs erzielt werden. Hier stimmen 88% der aktivierten Gene und 95% der supprimierten Gene überein (Tabelle 3). Etwas geringer ist dagegen die Übereinstimmung zwischen den beiden Mek1 siRNAs. 93% der aufregulierten Gene werden durch beide siRNA Duplexe reguliert, aber nur 79% der aufregulierten Gene. Ähnliches gilt für die beiden Erk1 spezifischen siRNAs. Die beiden Genexpressionsprofile zeigen bei den supprimierten Genen eine Übereinstimmung von 74% und bei den aufregulierten Genen werden 87% in gleicher Weise beeinflusst (Tabelle 3).

Mehr noch als die Anzahl an regulierten Genen interessieren die Gene selbst, die durch die jeweiligen Behandlungen reguliert werden. Lassen sich bestimmten Phänotypen spezifische Genexpressionsmuster zuordnen? Wie bereits in Kapitel 3.2.4 und 3.3.3 beschrieben, resultiert die Inhibition von A-Raf und Mek2 in einer starken Wachstumshemmung und einem abgerundeten Phänotyp der Zellen (Abbildung 23a, Abbildung 39b). Interessanterweise werden 61% der Gene, die durch die Hemmung von A-Raf in ihrer Expression beeinflusst werden, in gleicher Weise durch die Inhibition von Mek2 reguliert (Tabelle 4, Anhang). Viele dieser Gene konnten bereits als Wachstumsregulatoren beschrieben werden. Die Lysyloxidase und Sparc beispielsweise werden durch beide Behandlungen aktiviert und haben durch die Modulation von Wachstumsfaktoren einen negativen Einfluss auf die Proliferation {Li, 2003 #134} {Sweetwyne, 2004 #242}. Im Gegensatz dazu werden die Gene für Vimentin, Kollagen und für die Ornithinedecarboxylase durch die Inhibition von A-Raf oder Mek2 in ihrer Expression gehemmt. Eine erhöhte Expression von Vimentin und Kollagen resultiert in einem Wachstumsvorteil {Wang, 2000 #262} {Degiorgio-Miller, 2005 #48}. Auch die verstärkte Expression der Ornithinedecarboxylase führt über eine positive Regulation von Wachstumsfaktoren zu einer erhöhten Proliferationsrate {Nemoto, 2002 #168}. Möglicherweise regulieren A-Raf und Mek2 die Proliferation der NIH3T3-pEJ Zellen über einen ähnlichen Mechanismus.

Wie bereits beschrieben, haben alle drei Behandlungen, die zur Reversion der transformierten Morphologie führen, den größten Einfluss auf das Genexpressionsprofil. Lässt sich auch diesem Phänotyp ein spezifisches Genexpressionsprofil zuordnen? Durch den Vergleich der drei Genexpressionsprofile konnte die Liste an Genen, die in der morphologischen Transformation eine Rolle spielen, näher spezifiziert werden (Tabelle 5, Anhang). Unter den Genen, die durch alle drei Behandlungen in gleicher Weise reguliert werden, befinden sich eine Reihe von Kandidaten, für die bereits eine Rolle in der Transformation beschrieben wurde (Clic1, Ccnd1, Plf, Odc, Lox, Fgf7, Pmp22, Ltpb2, Col1a2 und Slpi). Beispielsweise führt die Lysyloxidase zur Reversion der Ras-vermittelten Transformation, in dem sie die Aktivität von NFκB hemmt {Jeay, 2003 #103}. Im

LIB	SYM	GENE	3T3-pEJ	U0126 6h	Mek1	Mek1-1	Mek2	Mek2-2
MPD1A12	Fstl1	follistatin-like 1	0,022	0,602	0,675	n.a.	n.a.	n.a.
MPDMYDC03	Crabp1	Crabp1	0,024	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
MPDMYDB03	Fstl1	follistatin-like 1	0,026	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
MPD1F12	Fstl1	follistatin-like 1	0,027	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
MPD1A08	Fstl	follistatin-like (Fstl)	0,031	0,877	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
MPD1F10	Fstl	follistatin-like (Fstl)	0,031	0,338	0,579	n.a.	n.a.	n.a.
MPDMYDD01	Slc1a3	solute carrier family 1 (glial high affinity glutamate transporter), member 3	0,035	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
MPD1C02	Fstl	follistatin-like (Fstl)	0,037	0,499	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
MPDMYDB09	Fbln5	fibulin 5	0,038	0,305	0,105	n.a.	n.a.	0,77 1,185
MPDMYDB04	Fstl	follistatin-like (Fstl)	0,039	0,794	0,681	n.a.	0,425	0,52 0,593
MPD1B11	Fstl	follistatin-like (Fstl)	0,041	0,922	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
MPD1F01	Ptpkr	protein tyrosine phosphatase, receptor type, K (Ptpkr)	0,054	0,519	0,602	n.a.	n.a.	n.a.
MPD1D01	Il1rl1	T1 protein	0,055	0,108	0,158	0,473	0,625	1,74 1,562
MPD1B02	Fstl	follistatin-like (Fstl)	0,061	0,79	0,579	0,68	0,579	1,04 1,155
MPD1B04	Lox	lysyl oxidase	0,065	0,145	0,16	0,65	0,741	0,23 0,422
MPDMYDB02	Cxcl5	chemokine ligand 5	0,08	0,381	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
MPD1B10	Fgf7	FIBROBLAST GROWTH FACTOR-7	0,083	0,194	0,216	n.a.	n.a.	n.a. 0,64
MPD1E03	Loxl	lysyl oxidase-like	0,085	0,248	0,394	0,7	0,57	0,68 1,106
MPD1B03	AV700930	ESTAV700930	0,087	0,188	0,107	0,352	1,28	0,51 0,395
MPD1C01	Gopc	ESTAK008806	0,088	0,362	0,531	0,77	1,088	0,84 0,691

MPDMYDA08	SST3	SST3	0,096	0,481	0,168	0,574	0,543	0,32	0,69
MPD1G11	Cyr61	Cyr61	0,102	0,346	0,463	0,313	0,463	n.a.	n.a.
MPD1B12	Amotl2	Leman coiled-coil protein	0,104	0,355	0,209	0,375	0,397	0,89	0,999
MPD1C04	Colec12	scavenger receptor with C-type lectin	0,108	0,256	0,214	0,79	0,914	0,76	1,249
MPD1D06	Acta2	Actin alpha	0,11	0,357	0,422	1,015	1,08	1,23	1,114
MPD1A07	Fstl	follistatin-like (Fstl)	0,117	0,217	0,146	0,505	0,697	0,84	0,719
MPD1F11	Grem2	gremlin 2 homolog, cysteine knot superfamily (Xenopus laevis)	0,12	n.a.	n.a.	0,45	1,158	0,73	0,675
MPD1A09	Gas1	Gas1	0,146	0,416	0,367	0,74	0,713	1,02	0,807
MPDMYDA02	Elp3	ESTAK012072	0,151	0,465	0,42	0,62	0,878	0,77	1,01
MPD1D02	Pdgfra	Pdgfra	0,155	0,63	0,912	n.a.	n.a.	0,66	1,271
MPD1F03	AY007814	ESTAK018112	0,167	0,465	0,429	0,64	0,713	0,86	1,115
MPD1C12	Ly6	Ly6	0,177	0,196	0,252	0,4	0,429	n.a.	n.a.

SYM	Mek1+2	Mek1+2 72h	Mek1-1+2-1	Erk1	Erk1-1	Erk2	Erk2-2	Erk1+2	Erk1-1+2-2	HRASV12	HRASWT	A-Raf	EGFP	Kontrolle
Fst1l	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Crabp1	n.a.	n.a.	0,731	n.a.	n.a.	n.a.	1,002	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Fst1l	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Fst1l	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	1,213	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Fst1l	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Fst1l	n.a.	n.a.	1,132	n.a.	n.a.	n.a.	1,121	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Slc1a3	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Fst1l	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Fbln5	0,78	1,074	0,875	0,68	0,774	0,69	1,157	0,77	0,683	1,262	1,357	1,259	n.a.	0,688
Fst1l	0,488	n.a.	0,399	n.a.	0,385	n.a.	n.a.	n.a.	0,547	0,896	0,854	1,186	n.a.	n.a.
Fst1l	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Ptpkr	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Il1r1l	1,052	0,09	1,074	0,687	0,262	0,735	0,547	0,701	0,746	0,585	0,775	0,632	0,621	0,985
Fst1l	0,54	0,579	0,424	0,67	0,906	0,98	1,157	0,68	1,024	1,065	1,233	1,374	n.a.	n.a.
Lox	0,27	0,213	0,934	0,32	0,195	0,22	0,252	0,17	0,123	0,291	0,49	0,365	0,599	0,729
Cxcl5	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	0,054	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	1,069
Fgf7	0,265	0,383	0,374	0,279	0,359	0,307	0,57	0,145	0,108	0,619	n.a.	0,862	n.a.	n.a.
Loxl	0,71	0,285	0,861	0,762	1,185	0,894	0,791	0,923	0,729	1,015	0,884	1,094	0,578	n.a.
AV700930	0,65	0,63	0,786	0,59	0,523	0,08	0,248	0,189	0,14	0,586	0,63	0,416	0,713	n.a.
Gopc	0,416	0,285	0,492	0,59	0,357	0,438	0,439	0,243	0,195	0,424	0,366	0,585	n.a.	0,76
SST3	0,34	0,193	0,43	0,646	0,343	0,37	0,255	0,25	0,214	0,334	0,412	0,781	0,71	1,005
Cyr61	n.a.	0,503	n.a.	n.a.	0,297	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	0,636	0,586	0,544	n.a.	n.a.
Amotl2	0,63	0,814	0,897	0,374	0,313	0,296	0,198	0,155	0,184	n.a.	n.a.	0,793	0,56	0,56
Colec12	0,7	0,62	0,849	0,69	0,723	0,198	0,492	0,269	0,233	n.a.	n.a.	n.a.	0,66	0,74
Acta2	1,174	1,556	0,792	0,957	1,017	0,516	0,625	0,803	0,423	1,854	2,525	1,99	0,849	0,762
Fst1l	0,59	n.a.	0,648	0,56	0,459	0,16	0,221	0,36	0,31	0,775	0,682	n.a.	n.a.	0,749
Grem2	n.a.	n.a.	n.a.	0,288	0,256	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	0,686	n.a.	0,789	n.a.	n.a.
Gas1	0,704	0,793	n.a.	0,546	0,723	0,47	0,332	0,13	0,239	1,162	1,143	1,17	0,896	0,722
Elp3	0,644	0,556	0,749	0,646	0,85	0,74	1,005	0,862	0,737	0,343	1,225	1,122	0,688	0,85
Pdgfra	0,773	0,579	0,801	0,599	1,194	0,677	0,791	0,963	1,024	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
AY007814	0,627	0,8	0,786	0,928	n.a.	0,923	n.a.	0,698	0,362	0,506	0,449	0,546	0,753	0,78
Ly6	0,645	0,761	n.a.	0,748	0,623	0,116	0,102	0,183	0,132	0,543	0,727	n.a.	n.a.	n.a.

LIB	SYM	GENE	3T3-pEJ	U0126	U0126 6h	Mek1	Mek1-1	Mek2	Mek2-2
MPD1C09	Ptx3	PTX3	0,181	0,545	0,463	0,733	0,847	0,43	0,746
MPD1G03	Lxn	Latexin	0,186	0,414	0,31	0,641	0,766	0,921	1,28
MPD1C11	Marcks	Macs	0,193	0,335	0,279	0,32	1,601	n.a.	n.a.
MPD1A03	Pmp22	peripheral myelin protein, 22 kDa	0,206	0,471	0,425	1,051	1,009	0,66	0,886
MPD1D03	Ly6a	Ly6a	0,209	0,261	0,269	0,34	0,456	0,67	0,781
MPDMYDD05	Ltbp2	latent transforming growth factor beta binding protein 2	0,229	0,297	0,221	0,62	0,32	0,84	0,724
MPD1C08	6530405F15Rik	ESTAK018323	0,23	0,624	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
MPD1C03	Wisp2	WNT1 inducible signaling pathway protein 2 Wisp2	0,233	0,412	0,107	0,933	n.a.	n.a.	n.a.
MPD1G05	Cxcl12	Stromal cell derived factor 1	0,235	0,656	0,602	n.a.	n.a.	0,603	0,787
MPD1H02	Colla2	procollagen	0,242	0,098	0,254	0,47	0,713	1,78	1,914
MPD1A05	Dhrs8	dehydrogenase/ reductase (SDR family) member 8	0,259	0,557	n.a.	0,76	n.a.	0,551	0,445
MPD1H10	BC006874	ESTBC006874	0,268	0,412	0,382	0,97	1,114	0,55	0,835
MPDMYDB07	Sparc	Sparc	0,275	0,156	0,214	0,3	0,768	0,32	0,588
MPDMYDB01	1200016B17Rik	ESTBC011466	0,276	0,216	0,27	0,5	1,6	1,16	1,108
MPD1G12	Timp3	Timp3	0,278	0,798	1,599	1,039	1,159	2,11	1,908
MPDMYDB11	Grb10	Similar to growth factor receptor bound protein 10	0,278	0,157	0,273	0,33	0,167	0,36	0,478
MPDMYDA07	Ifng	serum amyloid A 3	0,297	0,349	0,385	0,595	0,669	0,49	0,453
MPDMYDB06	Adamts1	a disintegrin-like and metalloprotease with thrombospondin type 1 motif, 1	0,308	0,547	1,193	0,729	0,85	1,166	1,562
MPD1A01	Pten	phosphatase and tensin homolog	0,313	0,465	0,544	0,971	0,919	0,825	1,157
MPD1G06	Slc38a4	solute carrier family 38, member 4	0,327	0,721	1,35	1,12	1,157	1,33	1,481
MPDMYDD07	BM232927	ESTBM232927	0,349	0,323	0,485	0,642	0,601	0,54	0,397
MPD1E02	Slpi	secretory leukocyte protease inhibitor (Slpi)	0,388	0,162	0,365	0,14	0,114	0,42	0,394
MPD1F08	Thbs1	Thrombospondin 1	0,404	1,164	0,858	0,956	0,751	0,32	0,422
MPDMYDA05	E030026I10Rik	ESTAL441963	0,414	0,335	0,462	0,598	0,667	0,949	1,11
MPD1E01	Emb	embigin	0,432	0,743	0,92	0,58	0,557	0,74	0,553
MYD1H12	Actb	actin, beta, cytoplasmic	0,434	1,028	0,813	1,176	0,911	1,95	2,16
MPDMYDC04	Man2a1	mannosidase 2, alpha 1	0,437	0,341	0,488	0,97	1,115	0,777	0,723
MYD1C10	Prkair	ESTBC022684	0,437	1,028	1,17	0,648	0,781	0,933	1,279
MPDMYDC08	D17W _{sul55e}	ESTAK019011	0,449	1,235	0,741	0,82	0,85	0,992	1,279
MPD1H03	Mrg1	mrg1	0,476	0,272	0,231	0,52	0,394	0,56	0,526
MPDMYDC10	BM231940	ESTBM231940	0,484	0,582	1,001	0,667	0,597	0,943	1,105
MPDMYDB08	Tap2	MDR member3	0,487	0,74	1,015	0,926	1,291	0,24	0,675

SYM	Mek1+2	Mek1+2 72h	Mek1-1+2-1	Erk1	Erk1-1	Erk2	Erk2-2	Erk1+2	Erk1-1+2-2	HRASV12	HRASWT	A-Raf	EGFP	Kontrolle
Ptx3	0,32	0,58	0,431	0,763	1,129	0,941	1,009	0,71	0,918	0,728	n.a.	n.a.	0,914	n.a.
Lxn	0,664	0,359	0,871	0,82	1,113	0,82	0,807	0,725	n.a.	0,818	0,891	1,348	1,107	n.a.
Marcks	0,72	n.a.	0,992	0,506	0,4	0,101	0,252	0,159	0,183	0,581	0,503	n.a.	n.a.	n.a.
Pmp22	0,44	0,157	0,538	0,51	0,601	0,22	0,27	0,36	0,22	1,089	1,177	1,27	0,605	0,877
Ly6a	0,488	0,713	0,364	0,373	0,442	0,104	0,072	0,209	0,17	0,597	0,647	0,586	0,325	n.a.
Ltbp2	0,41	0,323	n.a.	0,43	0,359	0,308	0,251	0,253	0,267	0,185	0,313	1,177	0,613	0,677
6530405F15Rik	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Wisp2	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	0,4	n.a.	n.a.	n.a.	0,727	n.a.
Cxcl12	0,667	0,655	0,803	0,654	1,21	0,617	0,831	0,734	n.a.	0,778	0,938	0,786	0,866	n.a.
Colla2	0,44	0,26	0,712	1,322	1,197	0,33	0,289	0,45	0,351	2,56	2,235	1,989	1,387	1,079
Dhrs8	0,58	0,561	0,6	0,66	0,8	0,72	0,773	0,57	0,801	0,561	0,62	0,445	n.a.	0,68
BC006874	0,671	0,432	0,593	0,625	1,004	0,716	0,918	0,823	0,62	0,279	0,485	0,78	0,905	0,75
Sparc	0,31	0,262	0,306	3,598	2,963	0,55	0,365	1,982	0,465	0,313	0,397	0	1,15	1,099
1200016B17Rik	0,33	0,303	0,262	1,112	1,228	0,34	0,44	0,4	0,353	1,333	1,261	1,171	1,28	1,132
Timp3	2,43	0,8	2,459	2,21	0,644	1,094	1,171	0,885	0,78	1,368	1,272	2,028	1,53	0,89
Grb10	0,33	1,767	1,337	0,961	0,538	0,5	0,536	0,17	0,408	0,173	0,904	0,781	0,473	1,113
Ifng	0,463	0,155	0,366	0,616	0,425	0,56	0,429	0,681	0,556	0,632	0,411	0,586	0,723	0,639
Adamts1	0,75	0,851	1,008	1,038	1,21	0,843	0,805	0,8	1,092	0,682	n.a.	1,66	1,042	0,73
Pten	0,711	0,641	0,625	0,94	1,16	0,737	0,855	0,23	0,197	0,399	0,728	1,123	1,004	0,69
Slc38a4	1,7	1,361	0,795	0,92	1,227	0,74	0,802	0,82	0,628	0,315	0,307	1,217	1,1	n.a.
BM232927	0,47	0,364	0,387	0,748	0,527	0,38	0,248	0,36	0,394	1,016	1,16	0,839	0,698	1,157
Slpi	0,38	0,146	0,273	2,5	0,512	0,233	0,316	0,47	0,335	0,213	0,233	0,105	0,297	1,166
Thbs1	1,008	1,142	1,019	1,561	1,109	1,256	1,157	1,172	1,258	0,778	1,259	1,921	0,972	0,873
E030026I10Rik	0,739	0,741	0,543	0,734	0,911	0,35	0,494	0,678	0,636	0,806	0,856	1,282	0,693	0,833
Emb	0,921	0,835	n.a.	0,769	0,843	0,863	0,891	0,914	1,024	n.a.	n.a.	n.a.	0,627	n.a.
Actb	1,35	1,927	0,632	1,019	1,231	0,806	1,152	1,132	1,3	1,689	1,783	1,441	1,125	0,844
Man2a1	0,54	0,191	0,393	0,45	0,587	0,43	n.a.	0,34	0,394	0,795	0,889	0,78	1,171	0,92
Prkrr	0,898	0,852	1,022	0,823	1,166	0,967	1,101	0,707	1,13	n.a.	1,174	1,222	0,675	0,698
D17Wsu155e	0,46	1,01	0,513	0,808	0,847	1,064	0,858	1,122	1,162	1,471	1,403	1,164	n.a.	n.a.
Mrg1	0,759	0,216	0,632	0,44	0,365	0,18	0,314	0,12	0,147	1,001	1,079	1,466	0,837	0,791
BM231940	0,747	0,571	1,134	0,685	1,271	0,37	0,575	0,71	0,629	1,161	1,106	1,17	0,943	0,891
Tap2	0,27	0,231	1,206	1	1,141	0,828	0,885	0,862	0,679	0,857	0,781	0,737	1,391	0,956

LIB	SYM	GENE	3T3-pEJ	U0126	U0126 6h	Mek1	Mek1-1	Mek2	Mek2-1
MYD2F08	Ikbkb	inhibitor of kappaB kinase beta	0,491	1,008	1,269	0,639	1,091	0,651	1,12
MPDMYDC07	Lamp2	lysosomal membrane glycoprotein 2	0,493	0,399	0,463	0,938	1,054	0,4	n.a.
MPD1D04	Ldh2	Ldh2	0,494	0,691	0,645	0,44	0,195	0,25	0,422
MPDMYDB12	Cst3	cystatin C	0,57	0,341	0,4	1,045	1,009	0,56	0,513
MYD1F04	Actx	melanoma X-actin (Actx)	0,595	0,995	1,101	1,302	0,911	2,23	1,806
MPD1B06	Actr11	actin-related protein 11	0,602	0,654	0,864	0,823	1,179	0,44	0,452
MPD1H01	mt-Co3	cytochrome C oxidase III, mitochondrial	0,732	1,064	1,079	1,88	1,77	0,76	1,227
MPD1D07	6820402O20Rik	ESTBC011337	0,745	0,706	0,806	0,776	0,872	0,884	0,844
MYD1C06	BB023517	ESTBB023517	0,748	1,218	1,371	n.a.	1,733	n.a.	n.a.
MPD1C06	Il6st	ESTAK017211	0,76	0,686	1,175	0,7	0,771	0,32	0,256
MYD1F02	2700094K13Rik	ESTAK012609	0,778	0,865	0,733	0,465	0,335	0,965	0,844
MPDMYDD02	Scp2	sterol carrier protein 2	0,779	0,869	1,138	0,791	0,602	0,44	0,365
MYD1G12	Scyl1	SCY1-like 1	0,785	1,351	1,661	1,013	1,194	1,092	1,21
MPDMYDF12	Hspa5	heat shock 70kD protein 5 (glucose-regulated protein)	0,799	0,973	0,818	0,622	1,35	0,763	1,28
MPDMYDF02	Cln2	lysosomal pepstatin insensitive protease precursor	0,809	0,605	1,027	0,63	0,866	0,773	0,691
MPD1B09	Ptn	pleiotrophin	0,82	0,846	0,645	0,836	0,934	0,942	0,886
MPD1E12	C1s	serine protease	0,82	0,605	1,363	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
MYD1G10	BB864027	ESTBB864027	0,824	1,218	0,85	1,198	1,018	1,105	1,139
MPDMYDA09	Cpsf5	ESTBC008270	0,832	0,953	0,971	0,933	0,719	0,956	1,23
MPD1G10	BF682083	ESTBF682083	0,836	0,605	0,927	0,666	0,797	0,37	0,453
MPD1F07	Matr3	Matrin 3	0,84	0,98	0,92	1,059	1,145	1,18	1,28
MPDMYDH10	Agtrap	angiotensin II, type I receptor-associated protein	0,842	0,873	0,758	1,094	1,033	1,07	1,089
MPDMYDG02	Arbp	acidic ribosomal phosphoprotein P0	0,851	1,324	1,254	1,459	1,261	1,349	1,493
MYD1C03	Dlk1	stromal cell derived protein-1	0,867	1,097	1,034	1,269	0,718	1,255	1,446
MYD2A02	St13	suppression of tumorigenicity 13	0,887	1,69	1,296	1,208	1,003	1,223	1,147
MPDMYDE06	Actg	actin, gamma	0,904	1,307	1,08	0,992	1,064	1,434	1,372
MPDMYDG10	Pabpc1	poly(A) binding protein, cytoplasmic 1 (PABPC1)	0,92	1,391	1,142	1,302	1,034	1,151	0,911
MYD1D04	Stxbp3	syntaxin binding protein 3	0,94	n.a.	n.a.	1,936	1,784	0,696	1,058
MYD2E12	Es10	esterase 10 (Es10)	0,942	1,343	0,917	1,34	1,052	1,317	1,032
MYD1B02	Mapk6	mitogen-activated protein kinase 6	0,958	3,125	1,063	0,973	0,825	1,239	0,844
MPDMYDH01	Nedd4	ubiquitin protein ligase Nedd-4	0,96	1,051	1,143	0,933	1,06	1,213	1,009
MYD1A02	Actb	A-X actin	0,96	1,473	1,269	1,186	1,382	0,903	1,341

SYM	Mek1+2	Mek1+2 72h	Mek1-1+2-1	Erk1	Erk1-1	Erk2	Erk2-2	Erk1+2	Erk1-1+2-2	HRASV12	HRASWT	A-Raf	EGFP	Kontrolle
Ikbkb	0,699	n.a.	0,767	0,791	0,919	0,971	1,261	0,77	1,127	1,073	1,044	1,091	0,692	0,846
Lamp2	0,45	0,693	0,279	0,84	0,559	0,36	0,293	0,38	0,293	0,577	n.a.	n.a.	0,857	1,11
Ldh2	0,258	0,303	0,437	0,85	0,724	0,829	0,67	0,367	0,452	0,213	0,185	1,17	0,65	0,607
Cst3	0,668	0,425	0,588	1,003	1,138	0,38	0,466	0,44	0,401	0,736	0,843	0,77	1,218	1,155
Actx	1,368	1,542	1,672	1,265	1,843	0,94	1,126	1,266	1,571	2,505	2,407	3,399	1,175	0,891
Actr11	0,25	0,203	0,898	0,635	0,918	0,857	1,157	0,68	0,723	0,85	0,914	0,843	0,754	0,62
mt-Co3	1,149	0,65	1,015	0,47	1,606	1,049	1,081	1,534	1,975	1,123	1,166	1,235	1,583	1,405
6820402O20Rik	0,831	0,925	1,123	0,831	1,045	0,876	1,17	0,69	1,114	0,449	0,848	1,358	0,992	0,789
BB023517	0,938	0,925	1,259	0,736	1,154	1,156	1,315	0,968	1,166	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Il6st	0,7	0,99	0,74	0,752	1,298	0,86	1,123	0,68	0,806	0,627	0,586	0,737	0,865	0,71
2700094K13Rik	0,738	6,992	1,358	0,465	0,338	0,36	0,323	0,41	1,354	0,589	1,727	1,067	0,455	0,37
Scp2	0,36	0,337	0,469	0,938	1,109	0,971	0,791	0,687	0,791	0,631	0,691	0,837	0,89	1,151
Scyl1	1,131	0,736	0,811	1,201	1,467	1,285	1,358	1,695	1,193	1,498	1,402	0,831	1,389	1,205
Hspa5	0,92	1,22	1,127	1,292	1,201	0,787	0,698	0,776	0,733	0,419	0,445	0,469	0,805	1,053
Cln2	0,8	1,022	0,829	0,71	1,185	0,816	0,768	0,91	n.a.	1,34	1,452	0,758	0,864	0,675
Ptn	0,859	0,51	1,091	0,96	1,094	0,59	0,747	0,905	0,633	1,142	0,984	1,067	0,837	1,032
C1s	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	1,211	n.a.	0,733	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	0,69
BB864027	1,025	1,034	1,182	1,245	1,071	1,479	1,365	1,222	1,26	0,802	1,193	0,851	1,103	1,123
Cpsf5	0,696	1,157	1,159	1,227	1,113	1,219	1,259	0,837	1,008	1,844	1,99	1,323	1,106	0,72
BF682083	0,56	0,496	0,443	0,34	0,244	0,886	n.a.	0,7	0,717	0,425	1,119	0,796	0,966	n.a.
Matr3	1,064	1,094	0,728	0,929	0,781	1,231	1,072	0,55	0,366	0,682	0,636	1,446	1,189	0,838
Agtrap	0,913	0,898	n.a.	1,038	1,113	2,58	1,349	1,056	1,161	1,002	0,978	1,067	1,285	0,709
Arbp	1,307	1,087	1,123	1,265	1,009	1,338	1,365	1,52	1,363	1,715	2,211	1,219	1,466	1,452
Dlk1	0,993	0,899	0,856	1,007	1,25	0,907	1,052	1,265	1,001	2,178	1,288	1,518	n.a.	1,143
St13	1,125	1	1,067	0,997	1,202	1,161	1,198	1,44	1,708	2,228	1,819	1,174	0,978	0,883
Actg	1,225	1,12	1,148	1,073	1,13	1,504	1,708	1,308	1,016	1,498	1,358	1,249	0,755	0,844
Pabpc1	1,297	1,292	1,241	1,279	1,113	1,84	1,893	1,496	1,191	0,801	1,899	0,909	1,22	1,379
Stxbp3	1,196	n.a.	1,113	0,831	1,131	1,143	1,149	0,726	0,859	n.a.	n.a.	n.a.	0,961	0,768
Es10	1,365	2,228	1,249	1,48	1,528	1,329	1,223	1,966	2,317	1,26	1,196	1,067	1,027	1,007
Mapk6	1,099	1,109	1,175	1,314	1,129	1,265	1,457	1,294	1,466	1,039	1,269	0,898	1,111	1,119
Neddd4	1,053	1,405	0,919	2,22	2,764	1,181	1,092	1,143	0,682	0,805	1,085	1,122	1,249	1,473
Actb	1,082	1,117	0,858	1,374	1,144	1,258	1,365	1,345	1,084	0,602	1,106	1,219	1,118	1,388

LIB	SYM	GENE	3T3-pEJ	U0126	U0126 6h	Mek1	Mek1-1	Mek2	Mek2-1
MYD1D02	Ftl1	ferritin light chain 1	0,975	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
MYD2D08	Hnrpab	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A/B	0,986	1,317	1,329	1,015	1,228	3,31	2,388
MPDMYDG06	H3f3b	H3 histone, family 3B	0,991	1,184	1,229	1,35	0,885	1,415	1,106
MYD2A03	Surf4	surfeit gene 4	0,991	1,313	1,521	1,517	1,661	1,527	1,674
MYD1A11	Fbl	fibrillarin	1,006	1,298	0,828	1,134	0,686	0,968	1,11
MPDMYDE03	Ldh1	Lactate dehydrogenase 1	1,027	1,237	1,015	1,044	0,723	1,415	1,105
MYD2D03	Suil-rs1	suppressor of initiator codon mutations, related sequence 1	1,041	1,443	1,202	1,355	1,153	1,29	1,015
MYD2A09	Iap-2	type II IAP element with Allins	1,042	1,213	0,925	1,163	0,917	0,998	1,307
MYD2D06	Sdhb	succinate dehydrogenase complex, subunit B, iron sulfur (Ip)	1,048	1,376	1,465	1,139	0,92	1,192	1,144
MYD2D10	BB625118	ESTBB625118	1,096	1,384	1,079	1,132	1,145	1,132	1,157
MPDMYDF10	Psm7	proteasome (prosome, macropain) subunit, alpha type	1,101	1,258	1,04	1,072	1,186	0,984	0,781
MYD2E11	BI410195	ESTBI410195	1,11	0,953	1,241	1,34	1,47	1,362	1,12
MPDMYDC01	Cd24a	CD24a antigen	1,113	1,282	1,175	1,33	0,805	0,62	1,151
MYD1C09	mt-Atp6	ATP synthase 6, mitochondrial	1,142	0,888	0,841	1,284	0,85	1,026	0,844
MPDMYDE02	Prim2	DNA primase, p58 subunit	1,171	1,428	0,8	1,223	0,917	1,438	1,563
MYD2F09	Dncl1	dynein, cytoplasmic, light chain 1	1,195	1,648	1,157	1,435	1,31	1,398	1,686
MYD2F02	Wsb2	WD repeat and SOCS box-containing 2	1,199	0,944	1,138	1,324	1,229	1,116	1,562
MPDMYDG05	Rps21	ribosomal protein S21	1,261	1,342	1,067	1,431	1,009	1,402	1,185
MYD2A08	Aebp1	AE binding protein 1	1,278	1,332	1,045	1,263	1,009	2,94	3,374
MYD1B12	Rbbp4	retinoblastoma binding protein 4	1,291	1,312	1,469	1,222	0,775	0,95	1,21
MYD2F07	Tkt	transketolase	1,317	1,144	1,03	1,033	1,117	0,913	1,06
MPDMYDG03	AK013556	ESTAK013556	1,33	1,22	1,29	1,121	1,145	1,045	1,341
MPDMYDF11	Atp6v1g1	ATPase, H+ transporting, V1 subunit G isoform 1	1,365	1,593	1,107	1,466	1,373	1,161	1,017
MYD2C07	Ank	progressive ankylosis	1,393	3,997	2,397	1,159	1,601	1,444	1,688
MYD2B03	Hspa8	heat shock protein 8	1,411	1,607	0,932	1,35	0,911	2,31	2,179
MPDMYDF06	Cct2	chaperonin subunit 2 (beta)	1,432	1,227	1,086	0,68	0,554	0,902	1,257
MPDMYDH07	Pafah1b1	platelet-activating factor acetylhydrolase, isoform 1b, beta1 subunit	1,452	1,468	1,458	1,275	1,13	1,152	1,014
MPDMYDF01	Plp2	proteolipid protein 2	1,472	1,403	1,286	1,034	1,141	2,32	2,549
MYD1E03	Spp1	secreted phosphoprotein 1	1,508	2,553	6,907	1,99	4,74	0,923	1,071
MYD2D12	Psap	prosaposin	1,532	1,53	1,299	1,087	0,934	0,857	1,144
MYD2C02	Cops3	COP9 complex subunit 3 (COPS3)	1,564	1,313	1,081	1,341	1,186	1,414	1,562
MYD1E08	Atp1b3	ATPase, Na+/K+ transporting, beta 3 polypeptide	1,707	1,409	1,524	1,204	1,021	1,015	1,25

SYM	Mek1+2	Mek1+2 72h	Mek1-1+2-1	Erk1	Erk1-1	Erk2	Erk2-2	Erk1+2	Erk1-1+2-2	HRASV12	HRASWT	A-Raf	EGFP	Kontrolle
Ftl1	0,866	1,13	0,793	1,02	0,758	0,87	0,789	0,844	0,801	1,106	1,194	1,089	0,904	1,24
Hnrpab	2,426	4,383	2,932	2,22	2,525	1,243	1,127	1,329	1,446	1,024	1,318	1,344	0,953	1,092
H3f3b	1,327	1,24	1,166	1,138	1,382	0,947	1,147	1,367	1,205	1,218	1,543	1,081	1,027	1,174
Surf4	2,1	1,514	1,863	1,121	1,319	1,325	1,232	1,567	1,467	1,227	1,264	1,393	1,24	1,083
Fbl	1,034	1,125	1,143	1,997	1,166	1,522	1,772	1,207	1,12	1,264	1,187	1,067	1,017	0,91
Ldh1	1,136	2,133	1,066	2,22	1,283	1,223	1,203	1,114	0,85	0,782	1,161	1,061	1,028	1,126
Suil-rs1	1,318	1,477	1,167	0,996	1,074	1,396	1,17	1,417	1,27	1,07	0,969	1,067	1,217	1,229
Iap-2	0,66	1,246	1,253	1,243	1,223	1,442	1,519	0,56	1,217	1,061	1,562	1,113	1,009	1,042
Sdhb	1,202	1,215	1,171	1,187	1,261	1,445	1,626	1,302	1,241	0,924	1,127	1,17	1,286	1,193
BB625118	1,224	1,344	1,073	1,252	1,092	1,313	1,149	1,379	1,249	0,806	1,088	1,136	1,219	1,08
Psm7	0,961	1,364	0,875	1,126	1,083	1,469	1,157	1,179	1,353	3,178	2,706	0,872	1,123	1,137
BI410195	1,001	2,074	1,064	1,229	1,58	1,653	1,152	1,103	1,275	1,709	1,913	1,99	1,612	0,941
Cd24a	1,292	1,402	1,079	2,02	0,837	1,478	1	1,11	1,066	0,837	1,097	1,17	1,143	1,4
mt-Atp6	0,69	1,376	1,413	0,79	0,817	1,028	1,253	0,77	1,179	1,143	1,052	0,898	1,144	1,21
Prim2	1,382	1,899	1,262	0,819	1,106	1,245	1,164	0,944	1,084	1,071	1,363	1,403	0,949	1,043
Dncl1	1,347	0,97	0,794	1,479	1,706	1,55	0,899	1,65	1,254	1,551	1,436	1,593	1,426	1,209
Wsb2	0,926	1,298	n. a.	1,041	1,208	1,255	1,354	1,028	1,267	1,709	1,583	1,661	1,444	0,783
Rps21	1,193	1,172	0,914	1,207	0,914	1,126	1,391	1,466	1,321	1,114	1,171	1,226	1,284	1,32
Aebp1	1,99	3,181	1,744	1,321	1,909	1,345	1,148	1,491	1,358	1,831	2,017	1,452	1,251	1,112
Rbbp4	1,163	1,71	1,225	1,258	0,925	1,347	1,669	1,218	1,709	1,663	1,936	1,344	1,102	1,189
Tkt	1,033	0,878	0,869	1,359	1,008	1,781	1,541	0,979	0,741	1,219	1,138	1,018	1,092	1,033
AK013556	1,14	1,15	1,015	0,898	0,992	1,387	1,122	1,627	1,251	0,951	1,084	1,263	1,112	1,161
Atp6v1g1	1,148	1,791	1,03	1,453	1,08	1,07	1,14	1,564	1,258	1,113	1,044	1,038	1,538	1,557
Ank	1,176	1,157	1,412	1,387	2,282	1,95	2,061	2,027	2,698	1,229	1,016	1,584	1,518	1,462
Hspa8	1,335	1,78	1,571	1,212	1,655	1,328	1,602	1,043	1,088	2,272	1,911	1,169	1,015	0,92
Cct2	1,12	1,056	1,064	1,421	1,292	1,334	1,441	1,162	1,264	0,925	1,114	1,323	0,985	1,178
Pafah1b1	1,228	1,141	0,881	1,235	1,142	1,278	1,32	1,498	1,226	1,074	1,048	1,031	1,286	1,341
Plp2	1,89	1,925	1,364	1,15	1,382	1,265	1,168	1,049	1,207	1,466	1,756	1,15	1,174	1,159
Spp1	0,59	0,51	0,425	1,99	2,352	1,551	1,901	5,323	3,635	5,081	1,149	1,082	1,843	1,741
Psap	0,876	0,915	0,68	1,354	1,172	1,158	0,887	1,663	1,386	0,817	0,935	1,08	1,199	1,587
Cops3	1,418	1,195	1,72	1,089	1,185	1,406	1,708	1,423	1,33	1,131	1,1	1,34	1,361	1,288
Atp1b3	0,989	1,233	1,095	1,35	1,159	1,298	1,805	1,275	1,164	1,03	1,04	1,123	1,741	1,257

LIB	SYM	GENE	3T3-pEJ	U0126	U0126 6h	Mek1	Mek1-1	Mek2	Mek2-1
MYD2E05	Clic1	chloride intracellular channel 1	1,771	1,763	2,145	1,623	1,897	1,995	2,46
MPDMYDE01	Atf4	activating transcription factor 4	1,912	1,477	0,804	1,239	1,157	1,335	1,341
MYD2C10	Airap	arsenite inducible RNA associated protein	2,022	2,827	3,247	1,001	0,874	1,161	1,446
MYD1G06	Vim	Vimentin	2,059	1,542	1,349	1,334	1,032	2,411	5,487
MYD1F03	AC126553	ESTAC126553	2,08	1,882	2,282	1,011	1,29	1,125	0,956
MYD1H06	Ctxn	Cortexin	2,117	2,228	2,195	1,155	1,106	0,896	0,741
MYD1A05	Pitx1	paired-like homeodomain transcription factor 1	2,156	2,14	1,83	0,797	0,781	1,042	1,014
MYD2C06	Slc20a2	solute carrier family 20, member 2	2,156	3,326	2,805	1,154	1,372	1,82	2,497
MPDMYDH04	1810045K17Rik	1810045K17Rik	2,184	1,205	1,392	2,1	2,894	1,25	1,806
MYD1F01	Letm1	leucine zipper-EF-hand containing transmembrane protein 1	2,241	0,749	0,854	0,52	1,097	0,964	0,781
MYD2E02	Letm1	leucine zipper-EF-hand containing transmembrane protein 1	2,284	n.a.	n.a.	1,062	1,001	0,996	1,242
MYD2C12	Rtn3	reticulon 3 (Rtn3)	2,308	2,405	1,795	1,195	1,228	1,08	1,541
MYD1B01	BG245920	ESTBG245920	2,347	2,927	3,735	1,167	1,219	1,207	1,161
MYD2D11	Ccnd1	CyclinD1	2,369	2,326	5,46	1,316	0,814	3,47	2,211
MYD2B05	Arl10c	ADP-ribosylation factor-like 10C	2,411	2,976	2,387	0,942	1,097	0,657	1,382
MYD1C08	S100a6	S100 calcium binding protein A6 (calcyclin)	2,458	3,307	2,763	2,5	2,093	1,652	1,895
MYD1C02	Tfg	Trk-fused gene (Tfg)	2,515	2,583	2,478	1,242	0,976	1,132	1,244
MYD2C03	Coro1c	coronin, actin binding protein 1C	2,551	2,765	3,456	1,134	1,28	1,172	0,813
MYD2E03	Sdc1	syndecan 1	2,552	0,813	1,299	0,674	1,01	0,959	1,157
MYD2C01	BB710843	ESTBB710843	2,582	n.a.	n.a.	1,424	1,098	1,029	1,12
MYD2F03	Ier3	Immediate early response 3	2,609	2,31	2,619	0,982	1,232	0,957	0,831
MYD1B06	Tbx3	T-box 3	2,618	1,261	1,528	1,162	1,22	1,399	1,137
MPDMYDF09	BC010676	ESTBC010676	2,701	1,311	1,163	1,526	1,789	2,69	2,963
MYD2D09	Bloc1s2	biogenesis of lysosome-related organelles complex-1, subunit 2	2,713	2,433	2,167	1,205	1,332	1,228	1,077
MYD2B04	3110001D06Rik	ESTAK013938	2,717	2,134	3,403	0,91	1,289	0,926	1,185
MYD2C09	Pi4k2b	phosphatidylinositol 4-kinase type 2 beta	2,741	2,072	4,003	2,21	2,743	1,571	2,37
MYD2G02	BM234725	BM234725	2,81	1,108	1,515	1,076	0,713	1,052	1,16
MYD2F06	AA407930	ESTAF224494	2,83	1,129	3,85	1,1	1,686	1,401	1,552
MYD1H03	Vdac2	voltage dependent anion channel 2	2,851	2,598	3,981	1,149	1,161	0,915	1,163
MYD1A04	BC018188	ESTBC018188	2,977	3,092	3,706	1,018	1,108	1,168	1,298
MYD2C04	Dusp4	dual specificity phosphatase 4	3,039	2,666	4,031	1,179	1,383	1,034	0,899
MYD1G07	Prnp	prion protein	3,087	0,445	0,602	3,04	2,391	2,77	1,686

SYM	Mek1+2	Mek1+2 72h	Mek1-1+2-1	Erk1	Erk1-1	Erk2	Erk2-2	Erk1+2	Erk1-1+2-2	HRASV12	HRASWT	A-Raf	EGFP	Kontrolle
Clic1	1,701	1,863	1,989	1,607	2,173	1,703	1,908	2,162	2,511	3,176	2,809	2,28	1,679	1,109
Atf4	1,316	2,138	1,179	1,238	1,186	1,325	1,165	1,04	1,173	1,04	1,262	1,277	1,314	1,254
Airap	1,028	2,338	1,249	0,684	1,086	2,43	2,346	1,241	1,649	0,844	0,741	1,084	1,176	0,93
Vim	1,518	3,06	2,532	1,562	1,989	1,427	1,581	1,637	1,857	2,144	2,455	2,967	1,18	1,122
AC126553	1,235	1,752	n.a.	0,777	1,063	1,218	1,056	1,047	1,856	1,041	0,862	1,032	0,882	1,058
Ctxn	1,2	1,66	0,738	1,197	1,075	1,246	1,856	1,722	1,928	0,806	0,898	1,208	1,071	1,193
Pitx1	1,13	1,097	1,158	0,912	1,351	1,18	1,016	0,871	n.a.	1,008	0,919	1,011	1,012	0,976
Slc20a2	1,044	2,712	1,131	1,226	1,716	1,66	1,339	1,445	1,649	2,176	1,784	1,381	0,873	1,084
1810045K17Rik	2,71	1,891	1,175	1,119	1,354	1,155	1,008	1,452	1,084	1,106	0,802	1,195	1,339	1,036
Letm1	0,672	0,735	0,628	0,922	1,583	1,029	1,085	0,8	0,921	0,641	1,111	1,201	0,752	0,654
Letm1	1,105	1,274	1,045	0,876	1,139	1,213	1,058	1,163	1,084	1,089	1,168	1,227	0,911	0,819
Rtn3	1,039	1,135	0,916	1,176	1,015	1,244	1,349	1,579	1,079	1,549	1,466	1,514	1,27	1,302
BG245920	1,079	1,295	1,083	1,319	1,701	1,451	1,641	1,9	2,108	1,193	1,282	1,17	1,287	1,161
Ccnd1	3,049	4,029	0,853	2,24	3,514	1,196	1,157	2,619	2,7	1,229	1,01	1,202	1,152	1,095
Arl10c	0,677	0,564	0,51	0,662	0,627	0,44	1,135	1,468	1,197	0,963	1,084	1,131	0,864	1,207
S100a6	2,205	1,269	2,373	1,208	1,156	1,465	1,727	2,291	1,358	2,11	1,48	1,541	1,262	1,117
Tfg	0,977	1,306	1,114	1,17	1,142	1,313	1,1	1,199	1,085	0,801	0,863	1,289	1,248	0,795
Coro1c	1,56	1,952	1,651	1,022	1,072	1,568	2,357	1,558	1,66	1,135	n.a.	1,148	1,412	0,959
Sdc1	0,864	0,925	0,915	1,268	1,372	1,408	1,163	0,838	1,457	1,188	1,189	n.a.	0,936	n.a.
BB710843	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	1,24	1,229	1,12	n.a.	0,87
Ier3	0,992	1,695	1,081	2,57	0,463	1,238	1,129	2,18	1,153	0,601	0,562	0,643	0,98	1,737
Tbx3	1,87	1,687	1,176	1,454	1,727	1,32	1,173	1,488	1,571	1,135	1,148	1,176	1,441	1,312
BC010676	2,8	1,869	2,45	1,394	1,686	1,504	1,842	1,348	1,974	2,433	1,169	1,12	1,4	1,195
Bloc1s2	1,416	1,645	0,798	1,056	1,11	1,465	1,66	1,477	1,588	1,149	1,091	1,066	1,275	1,066
3110001D06Rik	0,76	n.a.	n.a.	1,032	n.a.	1,331	1,255	0,83	1,132	n.a.	n.a.	n.a.	1,036	n.a.
Pi4k2b	2,44	1,871	2,304	1,074	1,257	1,579	1,249	2,77	2,938	1,17	1,093	1,17	1,341	1,246
BM234725	0,984	1,898	0,871	0,879	1,171	1,034	1,196	1,453	1,054	0,747	1,103	1,139	1,159	1,076
AA407930	1,026	1,222	1,368	0,701	0,683	2,11	2,43	1,49	1,992	0,57	0,524	1,721	1,206	0,699
Vdac2	1,299	1,628	1,357	1,077	0,837	1,313	1,346	1,718	2,052	1,13	1,018	1,122	1,093	1,233
BC018188	1,322	1,866	1,165	1,215	1,834	1,463	1,721	2,89	3,411	1,024	1,084	1,345	1,223	1,094
Dusp4	1,413	2,087	0,779	0,866	1,121	1,189	1,465	2,263	2,803	1,229	1,106	1,024	0,849	1,006
Prnp	2,56	2,7	2,053	0,789	1,172	0,76	0,755	0,702	n.a.	1,289	1,186	2,215	0,833	0,891

LIB	SYM	GENE	3T3-pEJ	U0126	U0126 6h	Mek1	Mek1-1	Mek2	Mek2-1
MYD1C11	Rab7	RAB-7, member RAS oncogene family	3,18	2,271	9,318	0,391	0,423	n.a.	n.a.
MYD1D08	C78120	ESTC78120	3,196	0,784	1,109	2,6	2,178	3	2,54
MYD2F04	Ank	progressive ankylosis	3,302	2,356	2,233	1,212	1,308	1,445	1,967
MYD1B04	Hspa8	heat shock protein 8	3,324	2,994	2,387	1,272	0,831	1,35	1,153
MYD1A03	Gn	Granulin	3,332	3,206	2,266	0,869	1,28	0,794	1,102
MYD2E07	Fxyd5	FXYP domain-containing ion transport regulator 5	3,364	2,456	2,485	1,26	1,446	1,441	1,382
MYD2D02	Cap1	CAP, adenylate cyclase-associated protein 1	3,366	2,531	3,006	1,27	1,123	1,533	1,824
MYD1D09	Catns	catenin src	3,375	1,388	1,649	1,24	1,194	1,105	1,481
MYD1B03	Ctsl	cathepsin L	3,444	2,874	3,453	1,517	1,437	1,17	1,122
MYD2G01	BF388816	ESTBF388816	3,545	2,678	4,669	2,36	2,949	2,274	2,048
MYD2C08	Pif	proliferin	3,604	3,67	2,637	2,482	3,48	2,632	4,281
MPDPMYDG11	Gag	GAG POLYPROTEIN	3,627	0,755	0,588	1,055	1,437	1,087	1,211
MYD2A11	BE912629	ESTBE912629	3,718	2,302	2,778	0,698	1,01	1,065	1,192
MYD1C01	Col6a3	procollagen, type VI, alpha 3	3,911	1,229	1,299	2,01	2,56	2,34	2,764
MYD2B06	D7Ert4743e	ESTAK005327	3,996	2,924	2,617	0,938	1,185	0,954	1,297
MPDPMYDH11	BB752777	ESTBB752777	4,095	1,168	1,268	2,58	3,374	1,55	1,966
MYD1G04	BY754984	ESTBY754984	4,642	1,066	1,259	1,809	2,56	1,994	7,781
MPDPMYDF08	BB795472	ESTBB795472	4,691	1,411	1,244	2,24	1,911	1,211	0,911
MYD1E06	Neol	neogenin	4,749	2,512	2,742	1,153	0,781	1,144	1,21
MPDPMYDE08	MMIAP1IB	A-particle element encoding integrase and gag	4,91	0,54	0,718	2,4	4,966	2,116	1,372
MYD2B12	Got1	cytosolic aspartate aminotransferase isoenzyme	4,91	3,23	5,653	1,159	0,911	2,77	4,389
MYD2D04	Kcnn4	potassium intermediate/small conductance calcium-activated channel	5,625	2,024	3,224	1,305	0,88	0,943	1,099
MYD2F12	Fabp5	fatty acid binding protein 5	5,894	1,174	1,304	2,12	2,561	1,771	2,371
MYD1H02	Tmsb4x	Tmsb4x	5,926	2,575	3,076	1,375	1,349	2,27	2,558
MYD1F12	Odc	ornithine decarboxylase	6,167	3,29	2,753	1,747	1,612	3,013	2,195
MYD1G11	Lec-a	LEC-A	6,341	0,622	0,901	2,49	2,064	3,21	2,213
MYD1H11	Iap	intracisternal A particles	6,807	1,132	1,142	2,88	3,852	2,92	2,37
MYD1H01	2210408O09Rik	2210408O09Rik	7,636	1,282	1,851	1,468	2,388	1,444	1,686
MPDPMYDF07	Gch	GTP cyclohydrolase 1	8,436	3,528	4,63	2,67	3,847	3,2	2,37
MPDPMYDF03	Magea8	melanoma antigen, family A, 8	8,612	1,081	0,803	0,728	0,554	0,95	0,844
MYD1B10	Ctps2	Ctps2	8,774	2,242	3,01	1,37	1,562	2,217	2,403
MYD2A05	Hras	v-Ha-ras	9,16	1,375	1,558	1,132	1,185	1,207	1,12

SYM	Mek1+2	Mek1+2 72h	Mek1-1+2-1	Erk1	Erk1-1	Erk2	Erk2-2	Erk1+2	Erk1-1+2-2	HRASV12	HRASWT	A-Raf	EGFP	Kontrolle
Rab7	0,672	1,545	0,586	0,728	0,794	1,613	2,038	2,203	2,747	0,604	n. a.	n. a.	0,911	1,31
C78120	2,32	5,535	0,388	0,805	1,132	0,662	0,801	0,909	0,86	1,679	1,442	3,347	1,03	1,129
Ank	1,146	1,925	1,178	1,479	2,178	2,27	2,512	2,732	3,165	1,582	n. a.	2,23	1,55	1,158
Hspa8	1,345	2,129	1,36	1,322	1,767	1,473	1,127	1,171	1,082	1,335	1,55	1,157	1,393	1,24
Gm	0,867	0,736	0,856	0,48	0,338	0,876	0,747	0,843	0,734	0,733	0,708	0,632	1,057	1,432
Fxyd5	1,606	1,599	0,679	0,931	1,242	1,26	1,367	2,439	2,749	1,265	1,178	1,213	1,024	0,946
Cap1	1,959	1,765	0,59	1,039	1,582	2,1	2,466	2,549	3,874	2,183	1,401	1,3	0,91	n. a.
Catns	1,089	1,073	0,86	1,079	1,157	1,058	1,075	1,396	1,261	0,676	1,092	1,594	1,416	1,153
Cts1	1,351	1,959	0,971	2,15	2,656	2,97	3,816	3,542	3,972	1,34	1,466	1,209	1,299	1,344
BF38816	2,023	3,136	2,466	1,47	1,847	3,775	1,856	2,12	2,738	1,452	n. a.	2,563	2,064	0,923
P1f	3,273	1,743	3,143	0,881	1,258	1,496	1,765	3,871	2,518	4,636	2,745	1,204	2,054	1,065
Gag	0,896	0,897	0,789	0,718	0,62	0,84	1,103	0,773	0,625	1,083	1,163	1,451	0,774	0,837
BE912629	0,992	2,437	1,24	0,748	0,82	2,46	2,53	1,185	1,372	1,008	1,194	1,178	1,047	n. a.
Col6a3	2,14	2,37	2,624	1,336	1,829	1,34	1,157	1,717	1,149	1,437	1,28	1,583	1,671	1,422
D7Etd743e	1,306	1,67	1,166	1,97	1,08	2,37	2,709	2,292	2,944	0,857	0,795	1,212	0,442	1,065
BB752777	2,3	2,128	0,586	1,327	1,207	1,288	1,23	1,692	1,249	1,131	0,903	2,263	1,695	1,546
BY754984	2,168	1,784	0,625	1,164	1,371	1,278	1,169	1,721	1,456	1,349	1,161	1,374	1,452	1,173
BB795472	2,25	1,779	0,742	1,333	1,097	1,281	1,457	1,696	1,81	0,926	1,03	0,93	1,094	0,993
Neol	1,087	1,554	0,985	1,027	1,079	1,311	1,455	2,138	1,352	1,13	1,096	1,144	0,997	1,198
MMIAP11B	2,13	3,59	2,336	0,792	1,211	0,672	0,878	0,733	1,257	2,003	1,845	1,99	0,992	0,96
Got1	1,96	6,052	2,678	2,15	1,365	2,382	3,441	1,53	3,2	1,229	1,675	1,046	0,977	1,253
Kcnn4	1,02	2,107	0,869	1,185	1,375	2,289	2,846	1,693	2,245	0,905	1,184	1,194	1,126	0,689
Fabp5	2,07	1,876	2,068	1,35	1,465	1,327	0,978	1,72	0,86	1,035	1,012	1,193	1,763	1,542
Tmsb4x	1,657	2,262	1,988	1,201	1,257	2,21	2,621	3,322	2,872	1,769	1,897	1,105	1,304	1,11
Odc	2,895	5,277	3,301	2,784	1,172	4,05	6,281	3,187	4,059	2,532	2,372	2,388	1,418	1,153
Lec-a	2,51	0,911	2,417	0,761	1,162	1,51	1,309	0,989	1,373	1,539	1,097	2,786	1,055	0,836
Iap	2,148	1,731	0,464	1,067	1,695	1,282	1,17	1,763	0,849	1,026	1,183	1,114	1,486	1,123
2210408O09Rik	1,3	1,145	0,814	1,011	1,504	0,996	1,073	1,446	1,079	1,074	1,032	1,024	1,179	1,266
Gch	2,21	2,698	1,166	2,67	2,579	2,89	3,706	3,12	2,498	2,334	1,29	2,195	1,677	1,007
Magea8	0,56	1,938	0,924	1,95	1,281	1,275	1,142	0,642	1,161	1,781	2,333	0,932	0,741	0,828
Ctps2	2,16	2,325	0,971	2,36	4,678	2,92	4,317	3,12	2,286	0,543	0,585	2,698	1,766	1,223
Hras	1,157	1,357	0,875	0,997	1,526	1,293	1,162	1,283	1,262	2,944	3,123	1,151	1,071	0,897

LIB	SYM	GENE	3T3-pEJ	U0126	U0126 6h	Mek1	Mek1-1	Mek2	Mek2-1
MYD1C07	Itgb7	integrin beta 7	9,277	5,026	2,565	1,578	1,733	1,239	1,458
MPD1MYDG01	BM114666	ESTBM114666	10,97	4,585	5,483	1,088	1,195	0,947	1,138
MYD1F10	Gabarap	gamma-aminobutyric acid receptor associated protein	12,212	1,133	1,193	2,22	2,388	2,55	4,63
MYD1F05	Uba52	ubiquitin A-52 residue ribosomal protein fusion product 1	13,534	1,164	2,423	1,371	2,894	2,99	3,931
MPD1MYDD12	Hmga2	high mobility group AT-hook 2	13,542	5,014	4,983	0,43	0,186	0,35	0,782
MYD2B09	Iap1-1	intracisternal A particles, Ren2 linked	16,259	1,259	1,599	2,61	3,123	2,76	2,745
MPD1MYDG12	Ccl8	chemokine (C-C motif) ligand 8	16,331	1,177	1,1	1,401	1,821	0,953	1,146
MYD2B02	Rhbdf1	rhomboid family 1 (Drosophila)	16,468	1,123	1,36	2,39	2,751	2,76	3,117
MYD1D05	Ccrn4l	CCR4 carbon catabolite repression 4-like	18,918	1,246	1,275	3,933	2,92	2,74	3,176
MYD1H10	Ige-bf	IgE-binding factor mRNA	24,292	1,099	1,023	2,41	2,969	2,38	2,763
MPD1MYDH08	VL30	VL30	30,62	9,253	1,575	0,45	0,571	0,49	1,651
MYD1H07	GpnmB	glycoprotein (transmembrane) nmB	34,502	3,8	4,031	1,363	1,503	0,891	1,562
MYD1D06	AK016502	ESTAK016502	47,363	1,006	1,188	1,467	1,651	1,338	1,457
MPD1A10	Mfap2	microfibrillar-associated protein 2	n. a.	n. a.	0,125	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.
MPD1C10	BI686479	ESTBI686479	n. a.	n. a.	n. a.	0,57	0,837	0,53	0,837
MPD1D05	Myst4	MYST histone acetyltransferase monocytic leukemia 4	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.
MPD1E04	C1r	complement component 1, r subcomponent	n. a.	n. a.	n. a.	0,89	1,016	n. a.	n. a.
MPD1F04	C3	complement component 3	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.
MPD1F09	Gpc4	Glypican 4	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.
MPD1G09	BI348703	ESTBI348703	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.
MPD1H06	BG092549	ESTBG092549	n. a.	0,343	0,315	0,362	0,432	0,635	0,76
MPD1MYDE07	BB616656	ESTBB616656	n. a.	1,128	1,222	n. a.	1,129	1,257	1,138
MPD1MYDF04	BG914393	ESTBG914393	n. a.	n. a.	n. a.	0,61	1,218	0,61	0,442
MPD1MYDF05	AU021680	ESTAU021680	n. a.	0,594	n. a.	0,698	0,649	1,291	1,115
MPD1MYDG04	mKIAA1294	mKIAA1294	n. a.	1,891	2,172	1,9	2,56	2,12	2,369
MPD1MYDH06	BC018490	Similar to intracisternal A particles	n. a.	0,677	n. a.	1,89	1,446	1,69	1,979
MYD1A08	BC021422	similar to hypothetical protein FLJ21657	n. a.	n. a.	n. a.	0,815	0,689	0,714	0,781
MYD1C04	Herpud1	homocysteine-inducible, er stress-inducible, ubiquitin-like domain member 1	n. a.	n. a.	n. a.	0,73	1,186	0,83	1,078
MYD1G01	BB531470	ESTBB531470	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.
MYD1G03	BY763212	ANTIGEN LEC-A homolog	n. a.	n. a.	n. a.	0,823	1,292	1,979	2,158
MYD1H05	Cyb	LA9 mitochondrion	n. a.	n. a.	n. a.	2,751	3,752	n. a.	n. a.
MYD1H08	BF144553	ESTBF144553	n. a.	0,858	0,8	1,309	1,376	1,378	1,562

SYM	Mekl+2	Mekl+2 72h	Mekl-1+2-1	Erk1	Erk1-1	Erk2	Erk2-2	Erk1+2	Erk1-1+2-2	HRASV12	HRASWT	A-Raf	EGFP	Kontrolle
Itgb7	1,83	3,019	0,787	1,429	1,882	2,431	2,709	2,706	3,686	1,169	1,372	1,402	1,258	1,525
BM114666	1,271	2,022	1,209	1,005	0,724	1,391	1,701	2,36	3,16	0,543	0,838	1,066	1,098	1,189
Gabarap	2,152	1,819	0,648	1,175	1,612	1,344	1,065	1,733	1,209	1,29	0,843	1,655	1,564	1,156
Uba52	1,67	2,214	1,975	1,007	1,212	0,86	1,223	1,495	1,583	0,677	0,561	1,185	1,628	1,336
Hmga2	0,43	1,501	0,397	0,38	0,442	2,11	2,514	2,78	2,987	0,597	0,632	0,735	0,56	1,276
Iap1-1	1,576	1,764	0,665	1,295	1,472	1,391	1,169	1,727	1,152	1,188	1,184	1,229	1,447	1,249
Ccl8	0,41	0,198	0,341	0,44	0,527	0,377	0,607	1,424	0,734	1,179	0,388	0,251	1,55	1,747
Rhbdf1	2,004	1,776	0,659	1,197	1,28	1,306	1,364	1,858	0,85	1,245	1,131	1,254	1,904	1,339
Ccrn4l	1,968	1,203	1,35	1,418	1,843	1,369	1,207	1,731	1,064	2,725	2,187	2,196	1,761	1,388
Ige-bf	2,162	1,689	0,576	1,217	1,363	1,336	1,162	1,777	1,329	1,139	1,193	1,649	1,764	1,392
V130	1,35	1,624	0,869	2,849	1,474	2,88	3,089	3,087	3,821	0,295	0,422	1,48	0,523	1,069
Gpnmb	0,946	0,82	1,013	1,077	1,24	1,184	1,264	1,696	2,375	1,1	0,926	1,093	1,221	2,505
AK016502	1,208	1,181	0,851	1,19	1,349	0,931	0,862	1,448	1,179	1,594	1,372	1,253	1,509	1,076
Mfap2	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	1,176	0,734	n. a.	n. a.	n. a.
BI686479	0,803	0,539	0,917	0,766	1,011	0,815	1,3	0,869	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.
Myst4	0,696	n. a.	0,684	0,734	1,129	0,961	1,135	0,756	1,162	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.
C1r	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.
C3	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.
Gpc4	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.
BI348703	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.
BG092549	0,524	0,373	0,916	0,492	n. a.	0,123	0,071	0,213	0,289	0,371	0,387	0,542	0,562	0,688
BB616656	1,219	1,134	0,859	1	n. a.	1,016	1,148	1,106	1,094	1,71	1,323	1,024	n. a.	n. a.
BG914393	0,89	n. a.	n. a.	0,705	1,131	1,136	1,202	0,78	0,853	1,081	1,046	0,716	0,783	0,688
AU021680	3,01	n. a.	2,53	0,8	1,025	0,749	0,821	0,747	1,08	1,097	0,969	2,323	0,616	0,688
mKIAA1294	2,143	2,933	1,296	1,131	1,156	2,15	2,53	3,342	4,649	3,415	2,725	2,339	1,943	1,24
BC018490	2,98	n. a.	2,296	0,9	0,801	0,82	1,1	0,93	1,157	1,294	1,193	1,819	0,606	0,7
BC021422	1,024	1,14	1,072	0,794	1,078	1,101	1,254	0,74	1,088	1,202	1,124	1,321	0,666	0,684
Herpud1	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	1,008	0,73	0,701	0,846	n. a.	n. a.
BB531470	0,897	n. a.	n. a.	0,935	n. a.	0,942	1,111	1,663	1,989	n. a.	n. a.	n. a.	1,233	0,924
BY763212	2,64	n. a.	2,507	0,763	1,312	0,297	1,179	0,376	1,348	n. a.	n. a.	2,408	0,897	0,885
Cyb	2,234	1,422	0,749	0,949	1,222	1,289	1,163	1,672	1,248	1,225	1,147	1,001	1,443	n. a.
BF144553	0,949	0,781	1,017	0,76	1,14	0,79	1,142	0,912	1,288	n. a.	n. a.	1,709	0,934	0,863

SYM	Mek1+2	Mek1+2 72h	Mek1-1+2-1	Erk1	Erk1-1	Erk2	Erk2-2	Erk1+2	Erk1-1+2-2	HRASV12	HRASWT	A-Raf	EGFP	Kontrolle
3010027A04Rik	1,423	1,634	0,756	1	1,213	1,16	1,331	2,065	2,331	1,211	1,116	1,289	n.a.	n.a.
BB826050	0,967	1,484	1,2	1,02	1,158	2,31	1,695	3,267	5,926	1,722	1,78	1,708	1,331	n.a.
Gorasp2	0,842	n.a.	0,918	0,83	0,871	1	1,14	0,701	1,265	0,632	0,759	0,923	1,067	n.a.

Tabelle 3: Auswertung aller durchgeführten Hybridisierungen. Die Werte stellen das Verhältnis der Expressionsintensität jedes Genes zwischen den Kontroll- und den siRNA behandelten Zellen dar. Ein Wert von beispielsweise 2,944 bei der Probe HRASV12 für das Gen Hras bedeutet, dass die Intensitäten dieses Gen in der Kontrolltransfizierten Probe 2,944 mal so stark war wie in den mit HRAS-V12 siRNA behandelten Zellen. Dieses Gen wurde durch die Transfektion der HRAS-V12 spezifischen siRNA supprimiert. Die rot unterlegten Zellen der Tabelle stellen die Gene dar, deren Expression durch die Behandlung mit den jeweiligen siRNA Duplexen im Vergleich zu den Kontrolltransfizierten bzw. in den NIH3T3 im Vergleich zu den NIH3T3-pEJ Zellen mindestens 2fach supprimiert ist. Dagegen symbolisieren die grün unterlegten Zellen die Gene, deren Expression durch die unterschiedlichen Transfektionen im Vergleich zu den Kontrolltransfizierten Zellen bzw. in den NIH3T3 im Vergleich zu den NIH3T3-pEJ Zellen mindestens 1,7fach verstärkt ist.

Gegensatz dazu kooperiert die Expression der Ornithinedecarboxylase mit aktiviertem Ras bei der Transformation {Hayes, 2006 #88}.

Mit Hilfe der RNA Interferenz und der Mikorarray-Technologie ist es somit möglich, einem Phänotyp ein bestimmtes Genexpressionsprofil zuzuordnen.

Vermitteln einzelne Gene den Phänotyp oder braucht es ganze Gruppen von Genen? Exemplarisch wurden zwei Gene aus Tabelle 5 ausgewählt und deren Einfluss auf den transformierten Phänotyp mittels RNA Interferenz untersucht. Cyclin D1 ist als Zellzyklusregulator notwendig für das verankerungsunabhängige Wachstum von Tumorzellen {Li, 2003 #135}. Auch die Ornithinedecarboxylase hat wie bereits beschrieben einen deutlichen Einfluss auf die Transformation {Hayes, 2006 #88}.

3.6.2 Effekte der Ornithinedecarboxylase- und Cyclin D1-Inhibition in NIH3T3-pEJ Zellen

Für die Inhibition von Cyclin D1 und Ornithinedecarboxylase wurden jeweils zwei unterschiedliche siRNA Duplexe hergestellt. Der Nachweis der Inhibition erfolgte im Falle des Cyclin D1 mittels Westernblot Analyse (Abbildung 55). Die Transfektion von Cyclin D1 spezifischen siRNA Duplexen führt schon 24h nach der zweiten Transfektion zu einem vollständigen Verlust der Cyclin D1 Expression auf Proteinebene. Diese starke Suppression hält für die siRNA II bis mindestens 72 Stunden nach der zweiten Transfektion an. Dagegen ist der siRNA Duplex I nicht ganz so effizient. Hier taucht im Westernblot 72 Stunden nach der zweiten Transfektion eine cyclinspezifische Bande auf, die jedoch im Vergleich zu der Bande der Kontrolle wesentlich schwächer ist (Abbildung 55).

Trotz dieses starken „Knockdowns“ hat die Inhibition von Cyclin D1 keinen Einfluss auf die Morphologie der RAS-transformierten NIH3T3-pEJ Zellen (Abbildung 56). Die mit den beiden Cyclin D1 spezifischen siRNA Duplexen transfizierten Zellen zeigen das gleiche, spindelförmige Erscheinungsbild (Abbildung 56b,c) wie die Kontrollzellen (Abbildung 56a). Die Zellzahl ist in den mit siRNA transfizierten Zellen jedoch wesentlich geringer als in den Kontrollzellen (Abbildung 56). So resultiert die Transfektion der Cyclin D1-spezifischen siRNA I 48h nach der zweiten Transfektion

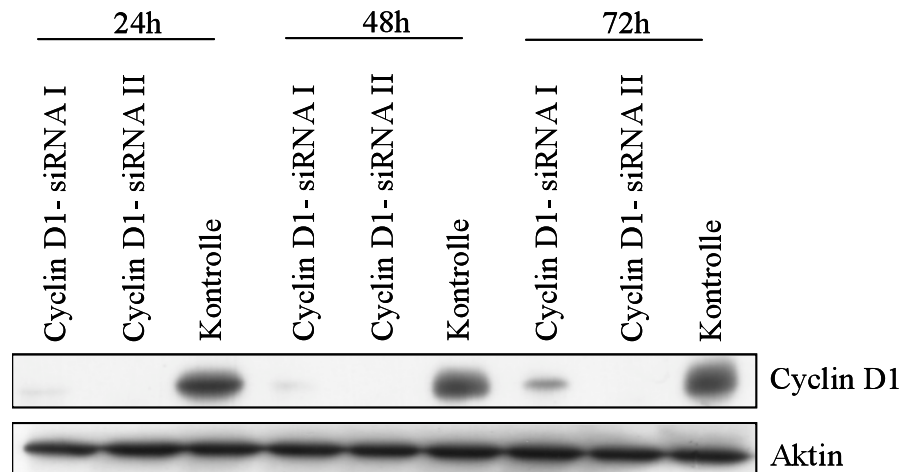


Abbildung 55: Westernblot Analyse der Cyclin D1 Proteinexpression nach Transfektion von NIH3T3-pEJ Zellen mit siRNA Duplexen spezifisch gegen Cyclin D1 und von Kontrolltransfizierten NIH3T3-pEJ Zellen. Die Gesamtproteinextrakte wurden 24, 48 und 72 Stunden nach der zweiten Transfektion gewonnen. Als Ladungskontrolle diente ein aktinspezifischer Antikörper.

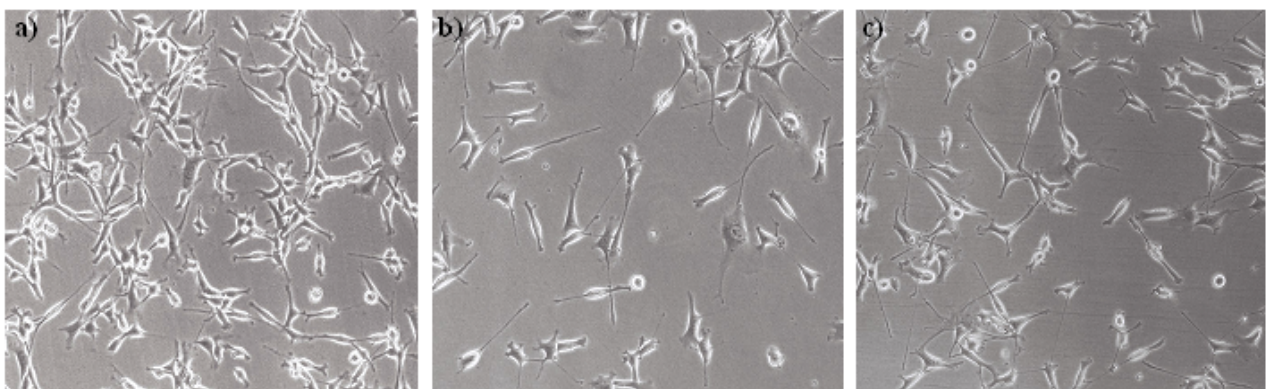


Abbildung 56: Morphologie der NIH3T3-pEJ Zellen 48 Stunden nach der zweiten Transfektion mit der Cyclin siRNA I (b), der Cyclin siRNA II (c) und von Kontrolltransfizierten NIH3T3-pEJ Zellen (a).

in einer Zellzahlreduktion von 40%, während die siRNA II die Zellzahl sogar um 60% gegenüber den Kontroll-NIH3T3-pEJ Zellen reduziert (Abbildung 57).

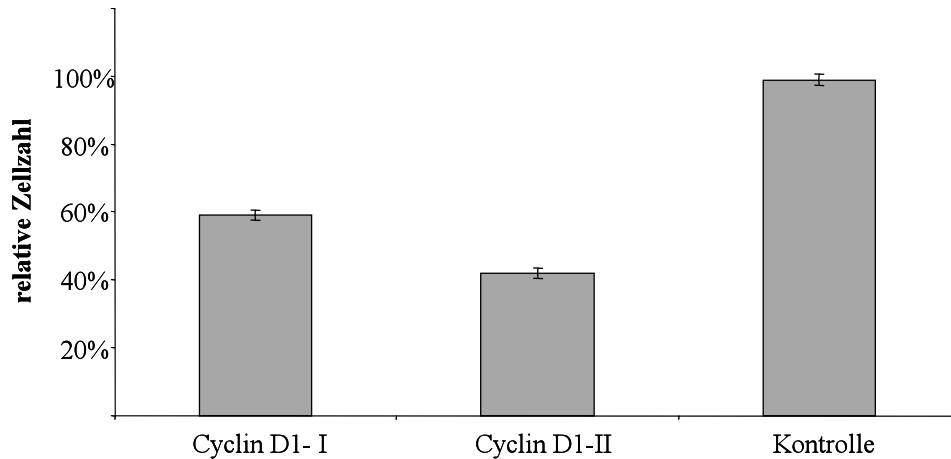


Abbildung 57: Graphische Darstellung der relativen Zellzahl in NIH3T3-pEJ Zellen 48 Stunden nach der zweiten Transfektion mit siRNA Duplexen spezifisch gegen Cyclin D1. Die Probe mit der höchsten Zellzahl wurde als 100% gesetzt und die anderen Werte darauf bezogen.

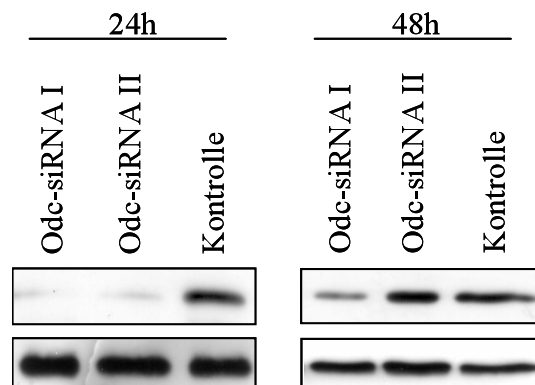


Abbildung 58: Westernblot Analyse der Ornithinedecarboxylaseproteinexpression von NIH3T3-pEJ Zellen transfiziert mit siRNA Duplexen spezifisch gegen Ornithinedecarboxylase (Odc) und von Kontrolltransfekten NIH3T3-pEJ Zellen. Die Zellen wurden zweimal in einem Abstand von 24 Stunden transfiziert und Gesamtproteinextrakte 24 Stunden und 48 Stunden nach der zweiten Transfektion isoliert. Um zu kontrollieren, dass eine gleichmässige Beladung der unterschiedlichen Proben vorlag, wurde ein aktinspezifischer Antikörper benutzt.

Die Inhibition von Cyclin D1 hat somit keinen Einfluss auf die Morphologie der NIH3T3-pEJ Zellen (Abbildung 56), reduziert aber wie erwartet deren Wachstum signifikant (Abbildung 57).

Auch der Nachweis der Funktionalität der beiden Odc-spezifischen siRNA Duplexe erfolgte mittels Westernblot Analyse (Abbildung 58). Beide gegen die Ornithine Decarboxylase gerichteten

siRNA Duplexe resultieren 24 Stunden nach der zweiten Transfektion in einer verminderten Odc-Proteinexpression (Abbildung 58). Interessanterweise ist die Wirkung der siRNA II 48 Stunden nach der zweiten Transfektion komplett aufgehoben, da die entsprechende Probe ein gleich starkes Signal im Westernblot aufweist wie die Kontrolle (Abbildung 58). Im Gegensatz dazu, zeigen die Zellen, die mit der siRNA I transfiziert wurden, auch zu dem späteren Zeitpunkt eine klare Inhibition der Odc- Proteinexpression (Abbildung 58).

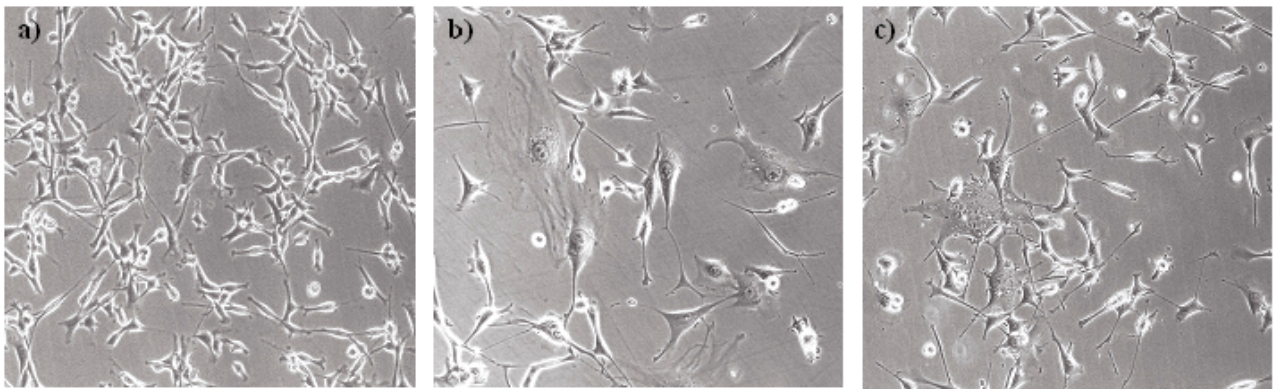


Abbildung 59: Morphologie von NIH3T3-pEJ Zellen 48 Stunden nach der Transfektion mit Oligofectamine ohne Duplex (a), mit der Odc-siRNA I (b) und der Odc-siRNA II (c).

Dieser Unterschied in der Effizienz zwischen den beiden unterschiedlichen Odc-spezifischen siRNA Duplexen macht sich auch in ihrem Einfluss auf die Morphologie der NIH3T3-pEJ Zellen bemerkbar (Abbildung 59). Die Transfektion der siRNA I resultiert in einer leichten Abflachung der Zellen und einem vermehrten Auftreten von vergrößerten Zellen (Abbildung 59b). Diese Zellen weisen einen stark vergrößerten Zellkörper auf, der so aussieht als hätte er, ausgenommen des Zellkernes, jede Struktur verloren. Auch die Zellen, die mit der siRNA II transfiziert wurden, weisen solche vergrößerten Zellen auf, allerdings in einem geringeren

Ausmaß (Abbildung 59c). Beide Duplexe resultieren nicht in einer Reversion der morphologischen Transformation.

Dagegen haben beide siRNA Duplexe einen starken Einfluss auf die Proliferation der NIH3T3-pEJ Zellen (Abbildung 60). So führt die Transfektion beider siRNA Duplexe zu einer Zellzahlreduktion von mindestens 68% (Abbildung 60).

Interessanterweise führt die gleichzeitige Transfektion der Ornithinedecarboxylase- und der Cyclin D1- spezifischen siRNA Duplexe zu keiner verstärkten Reduktion der Zellzahl und resultiert auch nicht in der Reversion des transformierten Phänotyps (Daten nicht gezeigt).

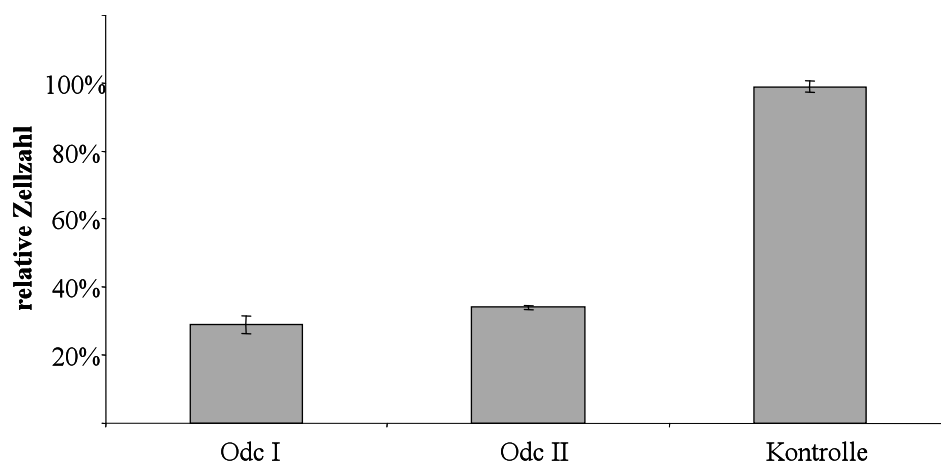


Abbildung 60: Graphische Darstellung der relativen Zellzahl 48 Stunden nach der zweiten Transfektion mit siRNA Duplexe spezifisch gegen die Ornithine Decarboxylase. Die Kontrolltransfizierten Zellen wurden als 100% gesetzt und die anderen Zellzahlen relativ dazu gesetzt.

In den NIH3T3-pEJ Zellen können Cyclin D1 und die Ornithindecarboxylase nur einen Teil des Phänotyps vermitteln. Die Ausbildung des transformierten Phänotyps scheint in den NIH3T3-pEJ Zellen durch die Aktivität mehrerer Gene reguliert zu werden.

Die Funktion einzelner Gene sollte nun in zwei anderen Systemen, den Rose A2/5 und den FE-8 Zellen untersucht werden.

3.7 Untersuchung von Ras regulierten Genen in den Rattenzelllinien FE-8 und Rose199-A2/5

3.7.1 Die Inhibition des Myb-bindenden Proteins P160 und des transkriptionellen Koaktivators p105 führt zu einer Hemmung der Proliferation von FE-8 Zellen

Für BARD1, P160, NF1 und p105 standen keine adäquaten Antikörper zur Verfügung, daher wurde die Effizienz der siRNA Duplexe auf RNA-Ebene mittels RT-PCR nachgewiesen (Abbildung 61). Die drei siRNA Duplexe, die spezifisch gegen die Bard1-mRNA gerichtet waren, wiesen eine hohe Effizienz auf (Abbildung 61a). Auch der p105-spezifische Duplex resultierte in einer starken Reduktion der entsprechenden mRNA (Abbildung 61d). Im Gegensatz dazu hatte die Applikation des P160 spezifischen siRNA Duplexes nur einen sehr geringen Einfluss auf die mRNA Menge (Abbildung 61b). Der NF-1 spezifische siRNA Duplex hatte keine Auswirkung auf die Expression des NF-1 Gens (Abbildung 61c).

Die Inhibition dieser Gene hatte in keinem Fall einen Einfluss auf den transformierten Phänotyp der FE-8 Zellen. Die Zellen behielten ihr spindelförmiges Aussehen. Anders verhält es sich dagegen bei dem Einfluss der verschiedenen siRNA Duplexe auf die Proliferation der FE-8 Zellen (Abbildung 62).

Die Hemmung des p105 Genes auf mRNA Ebene resultiert in einer signifikanten Reduktion der Proliferation der FE-8 Zellen. Auch die mittels RT-PCR nachgewiesene leichte Abnahme der P160 Expression führt zu einer, wenn auch nicht ganz so starken Reduktion des Zellwachstums. Im Gegensatz dazu zeigt die Applikation der Bard1-spezifischen siRNA keinen Einfluss auf die Proliferation der FE-8 Zellen. Da der NF-1 spezifische siRNA Duplex zu keiner nachweisbaren Reduktion der entsprechenden mRNA führt, überrascht es nicht, dass die Applikation des entsprechenden siRNA Duplex auch keine Auswirkungen auf das Wachstum der FE-8 Zellen hat.

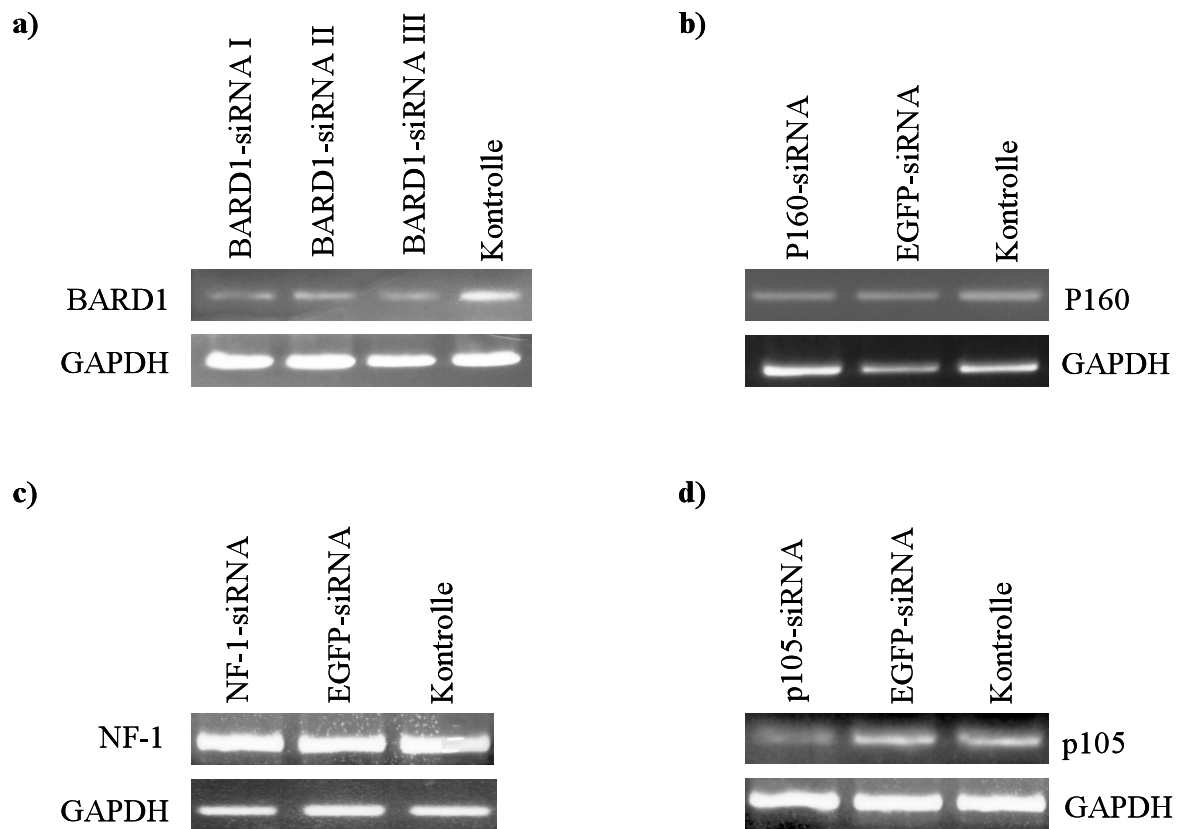


Abbildung 61: RT-PCR Analyse der mRNA Expression von Bard1 (a), P160 (b), NF-1 (c) und p105 in FE-8 Zellen. Die Zellen wurden zweimal in einem Abstand von 24 Stunden mit siRNA Duplexen spezifisch gegen Bard1, P160, NF-1, p105 und EGFP transfiziert und die RNA 28 Stunden nach der zweiten Transfektion isoliert. Mittels GAPDH-spezifischer Primer wurde die Menge an verwendeter RNA kontrolliert. Für Bard1 wurden zwei zusätzliche Duplexe verwendet, die von Dr. Matthias Truss (Labor für Pädiatrie, Charité) hergestellt wurden.

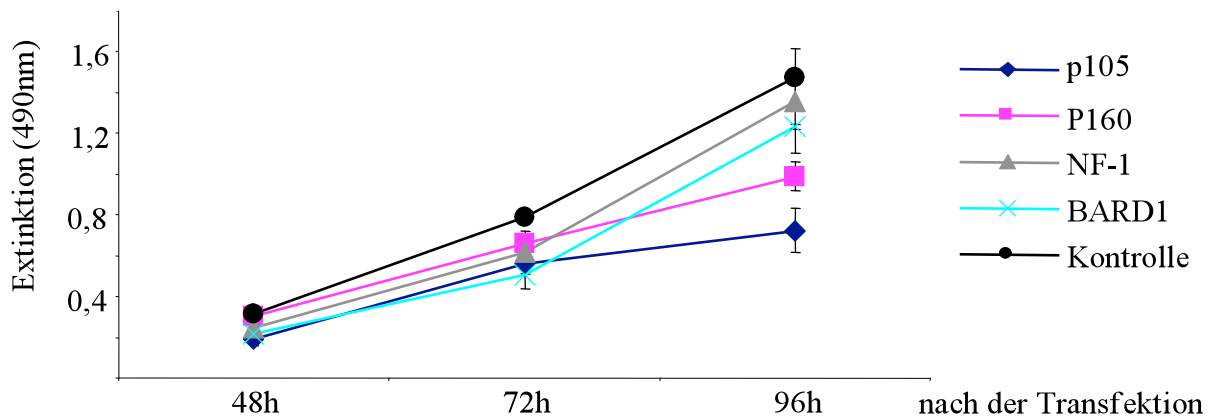


Abbildung 62: Graphische Darstellung des 2 dimensional Wachstum von FE-8 Zellen nach zweimaliger Transfektion mit siRNA Duplexen spezifisch gegen Bard1, P160, p105 und NF-1. 24 Stunden nach der zweiten Transfektion wurden die transfizierten Zellen in 96 Loch-Platten ausgesät und 24, 48 und 72 Stunden danach das Zellwachstum mittels eines XTT-Assay bestimmt.

3.7.2 Die Inhibition von Fra-1 und HMGI-C hat einen starken Einfluss auf die Proliferation von Rose199 A2/5 Zellen

Weitere 5 Gene, Fra-1, HMGI-C, Nab1, EI24, GADD153, wurden in den KRAS transformierten Ovarialepithelzellen getestet. Da nur für NAB1 und Fra-1 ein funktionierender Antikörper erhältlich war (Abbildung 63), wurde die Effizienz der anderen siRNA Duplexe mittels RT-PCR nachgewiesen (Abbildung 63).

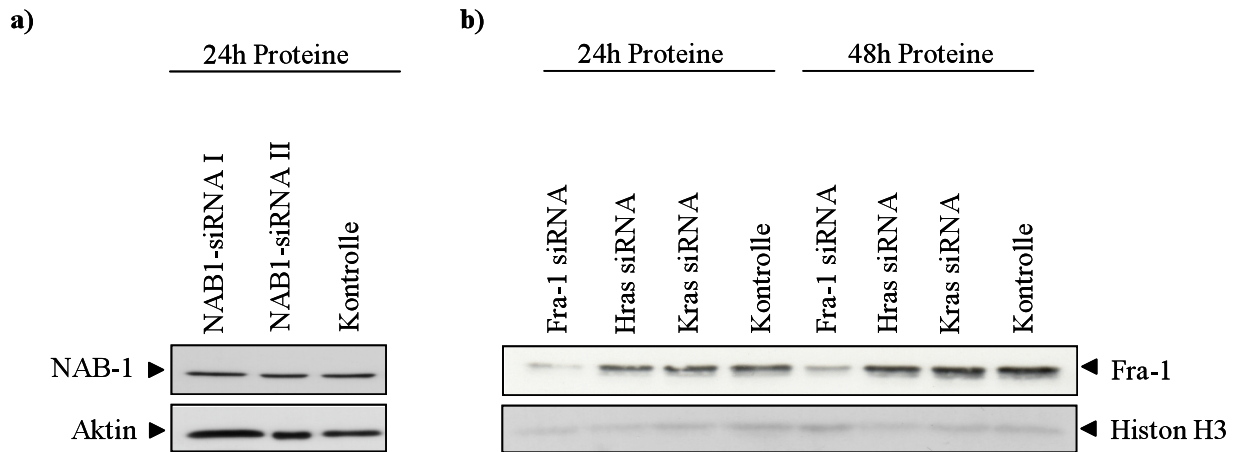


Abbildung 63: Westernblot Analyse der NAB1 (a) und Fra-1 (b) Expression 24 bzw. 48 Stunden nach der zweiten Transfektion. Für den Nachweis der Nab-1 Proteinexpression wurden Gesamtproteinextrakte verwendet, während es sich bei dem Fra-1 Westernblot um kernständige Proteine handelt. Als Ladungskontrolle diente für den NAB-1 Westernblot ein aktinspezifischer Antikörper, für den Fra-1 Westernblot wurde ein Histon H3 Antikörper verwendet.

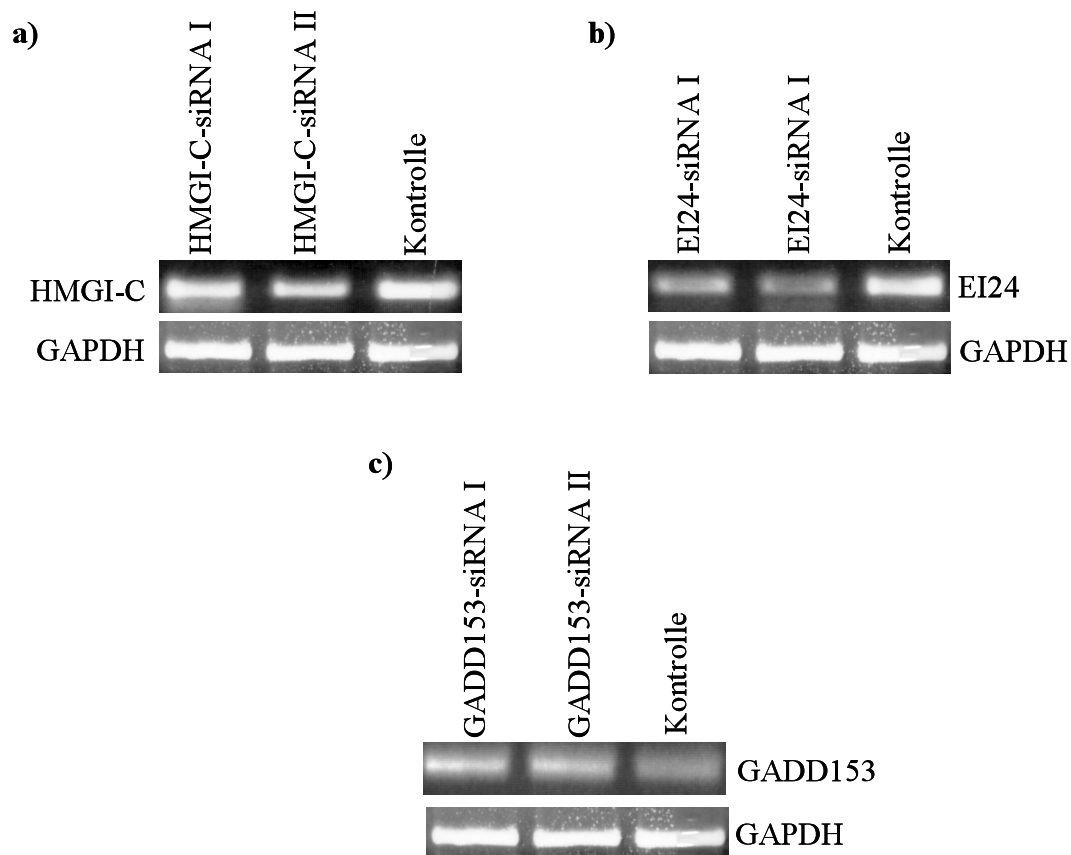


Abbildung 64: RT-PCR Analyse der mRNA Expression von HMGI-C, EI24 und GADD153 in Rose 199 A2/5 Zellen. Die Zellen wurden zweimal in einem Abstand von 24 Stunden mit siRNA Duplexen spezifisch gegen HMGI-C, EI24 und GADD153 transfiziert und die RNA 28 Stunden nach der zweiten Transfektion isoliert. Die Menge an eingesetzter RNA wurde mittels GAPDH spezifischer Primer kontrolliert.

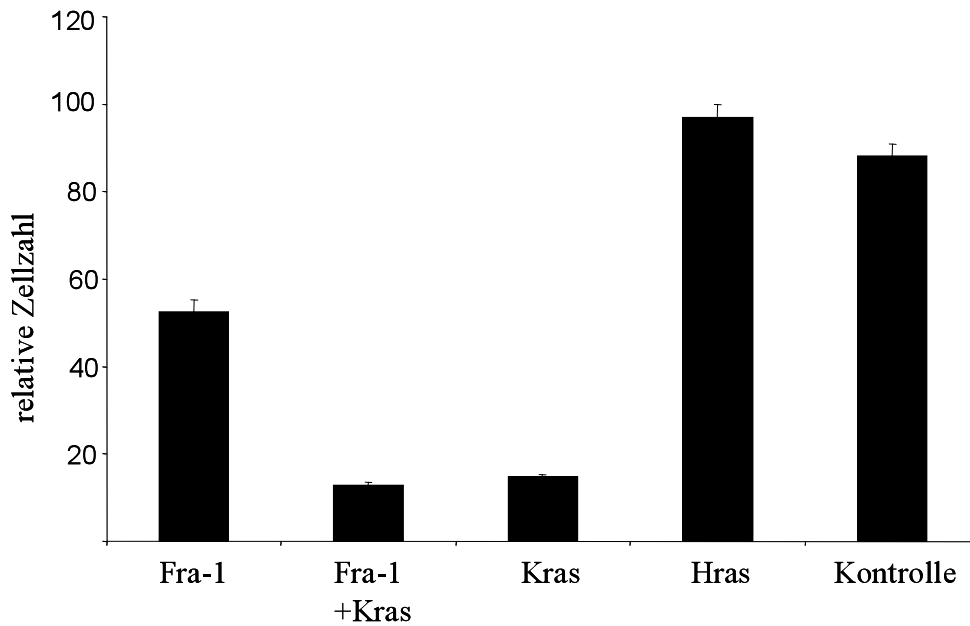


Abbildung 65: Graphische Darstellung der relativen Zellzahl der RoseA2/5 Zellen nach Transfektion von siRNA Duplexen spezifisch gegen Fra-1, KRAS, HRAS und Kontrolltransfizierten Zellen. Die Zellen wurden 48 Stunden nach der zweiten Transfektion ausgezählt und der höchste Wert gleich 100% gesetzt. Die anderen Proben wurden dazu in Relation gesetzt.

Gegen die Fra-1 mRNA konnte eine sehr effiziente siRNA hergestellt werden (Abbildung 63). Dabei führt die Inhibition der Fra-1 Expression zu einer Zellzahlreduktion von 50% im Vergleich zu den Kontrolltransfizierten A2/5 Zellen (Abbildung 65). Dagegen hat die Inhibition des KRAS-Onkogens in diesen Zellen ähnlich wie die HRAS Hemmung in den HRASV12 transformierten Nagerfibroblasten einen noch stärkeren Einfluss auf die Proliferation. Die Zellzahl ist hier um 90% reduziert (Abbildung 65).

Auch ein HMGI-C spezifischer siRNA Duplex führt zu einer Reduktion der spezifischen mRNA (Abbildung 64a). Der zweite HMGI-C siRNA Duplex hat dagegen keinen Einfluss auf die Expression der entsprechenden mRNA. Untersucht man den Einfluss der HMGI-C Inhibition auf das 2-dimensionale und das 3-dimensionale Wachstum der Rose A2/5 Zellen, so fällt auf, dass die Reduktion des HMGI-C Gens nur einen leichten Effekt auf das verankerungsabhängige Wachstum hat (Abbildung 66a) während die verankerungsunabhängige Proliferation sehr stark gehemmt wird (Abbildung 66b).

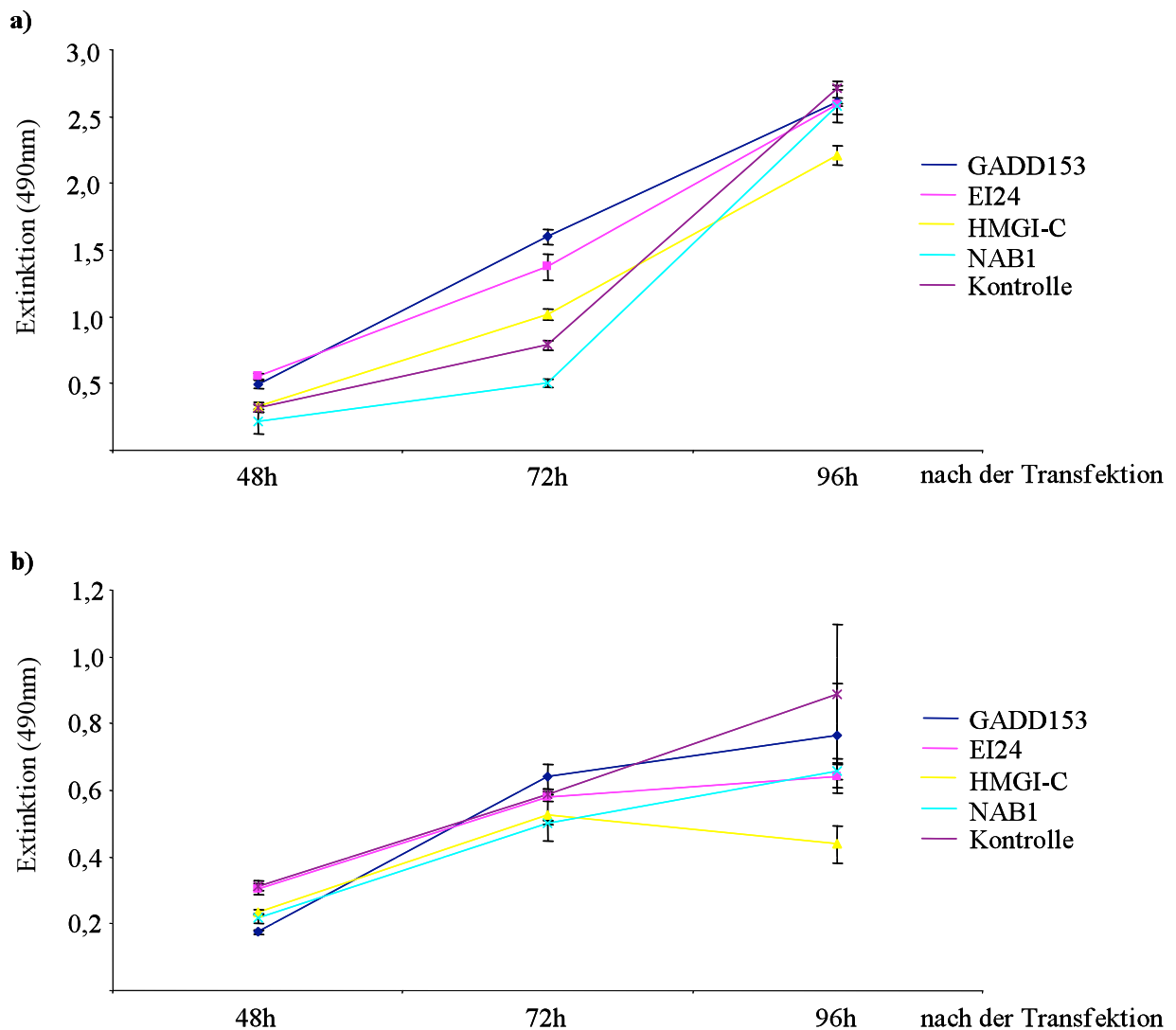


Abbildung 66: Graphische Darstellung des 2 (a)- bzw. 3 (b)-dimensionalen Wachstum von Rose A2/5 Zellen nach zweimaliger Transfektion mit siRNA Duplexen spezifisch gegen GADD153, EI24, HMGI-C und NAB1. 24 Stunden nach der zweiten Transfektion wurden die transfizierten Zellen in 96 Loch-Platten ausgesät und 24, 48 und 72 Stunden danach das Zellwachstum mittels eines XTT-Assay bestimmt.

Im Falle der Ei24 mRNA wiesen beide spezifischen siRNA Duplexe eine klare Effizienz auf (Abbildung 64). Allerdings zeigte die Inhibition dieses Gens keinen Einfluss auf das Wachstum der Rose A2/5 Zellen (Abbildung 66a, b). Im Gegensatz dazu konnte für die beiden

Kandidatengene NAB1 (Abbildung 63) und GADD153 (Abbildung 64) kein siRNA Duplex charakterisiert werden, der zu einer Reduktion der entsprechenden mRNA führte. Dementsprechend konnte auch kein Einfluss auf das Wachstum von Rose A2/5 Zellen nach der Transfektion dieser siRNA Duplexe festgestellt werden (Abbildung 66).

3.8 Unerwartete Effekte der siRNA Inhibition von ETF in 208F Zellen

Neben den durch die Ras Transformation induzierten Genen, konnte auch eine Vielzahl an Genen identifiziert werden, deren Expression durch die konstitutive Aktivierung von Ras gehemmt wird {Zuber, 2000 #291}{Tchernitsa, 2004 #244}. Eines dieser Gene ist der Transkriptionsfaktor ETF/Tead2, der sowohl in der Bibliothek der 208F/Fe-8 Zellen als auch der Rose199/Rose199-A2/5 Genbank als differentiell exprimierte Sequenz isoliert werden konnte. Um die mögliche Rolle von ETF/Tead2 in der Ras Transformation zu untersuchen, wurde die Expression dieses Transkriptionsfaktors in den 208F Zellen mittels RNA Interferenz inhibiert.

Da für den Nachweis von ETF/Tead2 kein Antikörper zur Verfügung stand, erfolgte der Nachweis der Effizienz der siRNA Duplexe mittels RT-PCR (Abbildung 67).

Die Applikation der ETF/Tead2 siRNA resultiert in einer starken Reduktion der mRNA 24 und 48 Stunden nach der zweiten Transfektion. Die EGFP-spezifische siRNA zeigt dagegen keinen Einfluss auf die Expression der ETF mRNA (Abbildung 67).

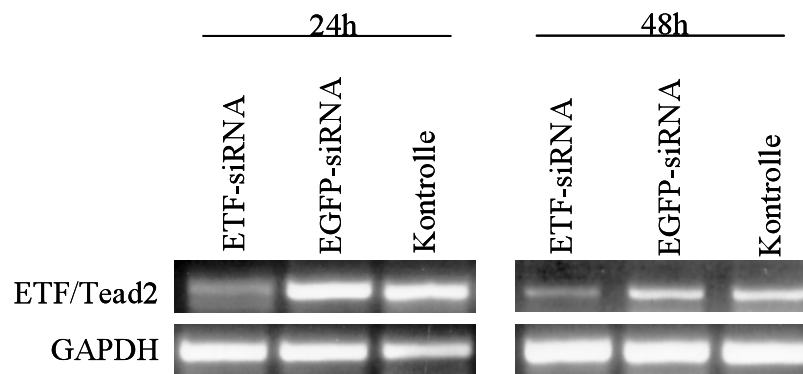


Abbildung 67: RT-PCR Analyse der ETF/Tead2 mRNA Expression in 208F Zellen. Die Zellen wurden zweimal in einem Abstand von 24 Stunden mit siRNA Duplexen spezifisch gegen ETF/Tead2 oder EGFP transfiziert und 24 Stunden und 48 Stunden nach der zweiten Transfektion RNA präpariert. Um zu überprüfen, ob sich in allen Proben gleichviel RNA befand, wurde parallel eine RT-PCR mit GAPDH-spezifischen Primern durchgeführt.

3.8.1 ETF/Tead2 spielt eine Rolle in der morphologischen Transformation von 208F Zellen

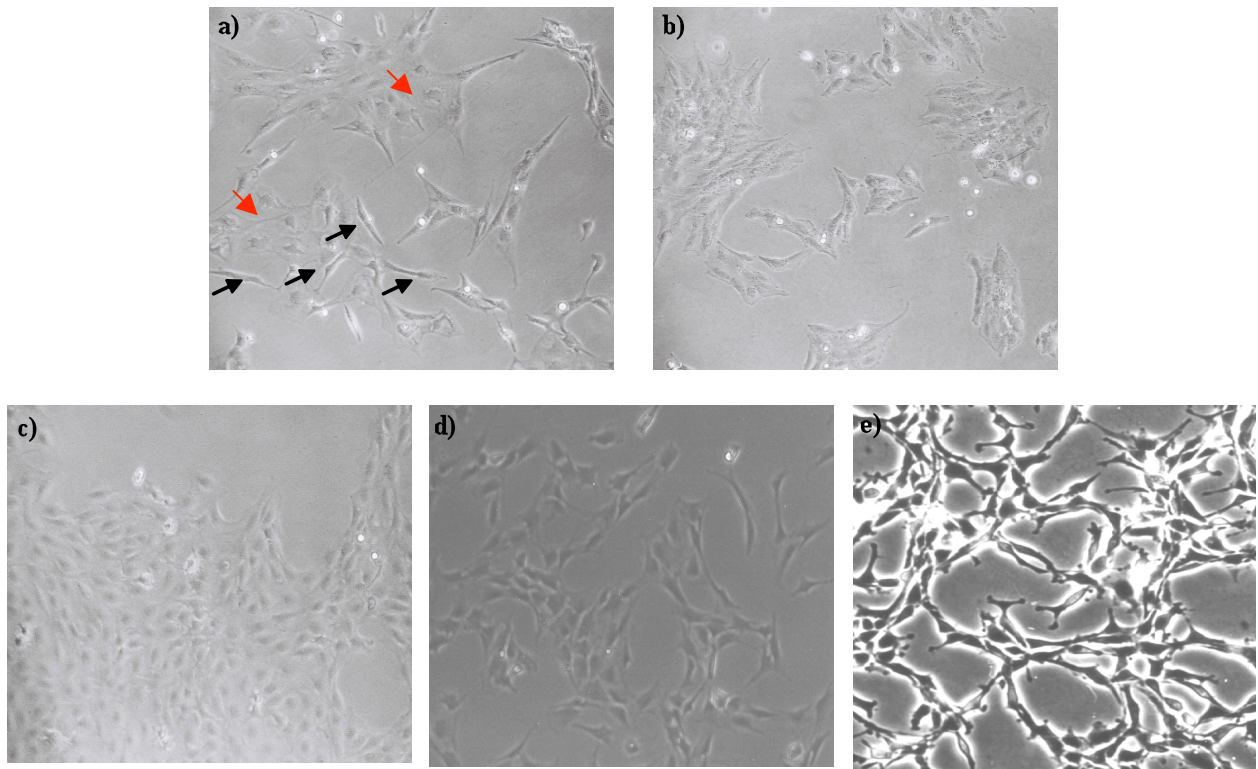


Abbildung 68: Morphologie von 208F Zellen, die zweimal im Abstand von 24 Stunden mit dem ETF/Tead2-siRNA Duplex I (a) oder II (b) oder Kontrolltransfiziert wurden (c). Die Bilder wurden 48 Stunden nach der zweiten Transfektion gemacht. Zusätzlich wurden die 208F Zellen in einem weniger konfluenten Zustand fotografiert (d), um so die Morphologie zu den behandelten Zellen besser vergleichen zu können. Des weiteren wurde ein Foto der FE-8 Zellen beigefügt (e), die das HRAS-transformierte Derivat der 208F Zellen darstellen.

208F Zellen weisen eine abgeflachte Morphologie auf und zeigen in einem subkonfluenten Stadium ein pflastersteinartiges Aussehen (Abbildung 68c). Nach Inhibition der ETF Expression beobachtet man, dass eine Vielzahl der Zellen eine mehr spindelförmige Morphologie annehmen (Abbildung 68a, schwarze Pfeile). Darin ähneln sie ihrem HRAS-transformierten Gegenstück, den bereits beschriebenen FE-8 Zellen (Abbildung 68d). Allerdings resultiert die Inhibition der ETF/Tead2 mRNA in einer heteromorphen Zellkultur. So kann man Zellen beobachten, die immer noch eine abgeflachte Morphologie aufweisen, jedoch einen wesentlich größeren Zellkörper aufweisen (Abbildung 68a, rote Pfeile). 208F Zellen, die mit einem alternativen ETF-spezifischen siRNA Duplex transfiziert wurden, zeigen keinen transformier-

ten Phänotypen, besitzen aber auch nicht die Morphologie der unbehandelten 208F Zellen (Abbildung 68b).

3.8.2 Einfluss des ETF/TEad2 Genes auf die Proliferation von 208F Zellen

Die Inhibition des ETF/TEad2 Gens führt scheinbar zu einer Transformation der Zellen. Die Applikation der ETF/TEad2 spezifischen siRNA Duplexe hat jedoch einen fast vollständigen Wachstumsstopp der 208F Zellen zur Folge (Abbildung 69). 208F Zellen, die mit dem ETF/TEad2 siRNA Duplex transfiziert wurden, zeigen über einen Zeitraum von 98 Stunden nach der zweiten Transfektion kein messbares Wachstum.

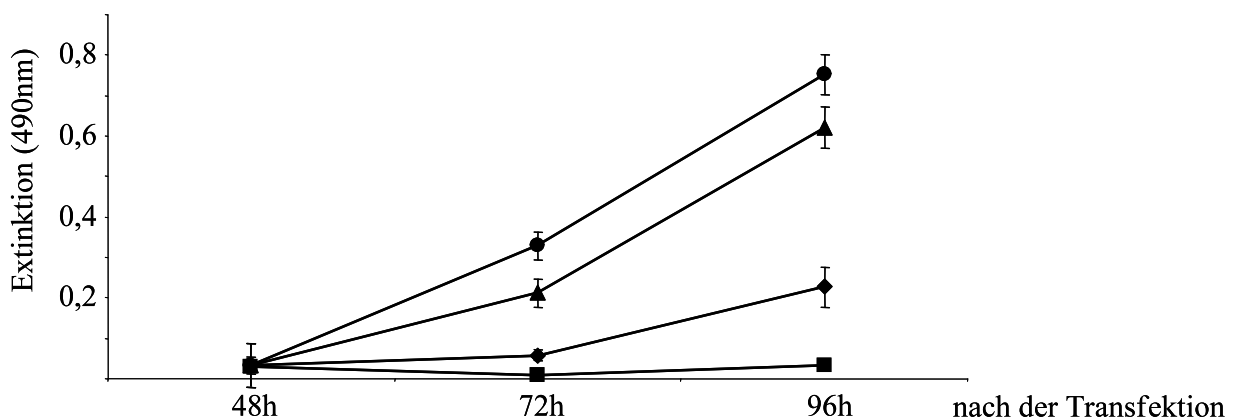


Abbildung 69: Graphische Darstellung der Proliferation von 208F Zellen 48, 72 und 96 Stunden nach der zweiten Transfektion. Die Zellen wurden zweimal in einem Abstand von 24 Stunden mit ETF/TEad2-siRNA I (Rechteck), ETF/TEad2-siRNA II (Raute), EGFP-siRNA (Dreieck) oder Kontrolltransfiziert (Kreis). 24 Stunden nach der zweiten Transfektion wurden 500 Zellen/ Loch einer 96-Loch-Platte ausgesät und die Proliferation über einen Zeitraum von 72 Stunden mittels eines XTT-Assays bestimmt.

Auch hier weist der siRNA Duplex II gegen ETF/TEad2 einen geringeren Effekt auf. Zeigen die mit diesem Duplex behandelten Zellen zwischen 48 und 72 Stunden nach der zweiten Transfektion noch kein messbares Wachstum, erholen sich die Zellen wieder und es ist ein

leichter Anstieg der Proliferationskurve zu erkennen. Im Gegensatz dazu, zeigt die Transfektion von EGFP-spezifischen siRNA Duplexen keinen negativen Einfluss auf das Wachstum der 208F Zellen (Abbildung 69).

3.8.3 Der Verlust von ETF/Tea2 spielt eine Rolle in der Aktivierung von Erk1/2

Die Veränderung der Morphologie von 208F Zellen nach der Transfektion mit ETF/Tea2 spezifischen siRNA Duplexen zum mehr spindelförmigen Phänotypen hin, legt die Vermutung nahe, dass die Zellen transformiert werden. In Vorarbeiten wurde bereits gezeigt {Zuber, 2000 #291}, dass sich die Aktivierung von Erk1/2 zwischen den 208F und den HRASV12-transformierten FE-8 Zellen unterscheidet. Die konstitutive Aktivität von HRAS führt zu einer ständigen Weiterleitung des Proliferationssignals an den Raf-Mek-Erk Signaltransduktionsweg. Dieses resultiert in einer stärkeren Aktivierung von Erk1/2, während in den 208F Zellen nur eine geringe Menge an phosphoryliertem Erk1/2 nachweisbar ist.

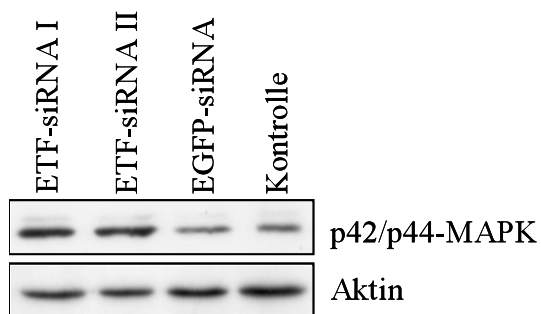


Abbildung 70: Nachweis der Menge an phosphoryliertem p42 (Erk2)/p44 (Erk1)- MAPK nach der Transfektion von 208F Zellen mit siRNA Duplexen spezifisch gegen ETF/Tea2 oder EGFP oder Kontrolltransfizierten Zellen. Die Zellen wurden zweimal mit den angegebenen Duplexen transfiziert und 48 Stunden nach der zweiten Transfektion Gesamtproteinextrakte isoliert. Als Ladungskontrolle diente ein aktinspezifischer Antikörper.

Nach der Transfektion von 208F Zellen mit den ETF/Tea2-spezifischen siRNA Duplexen kommt es zu einer verstärkten Aktivierung von Erk2 (Abbildung 70). Die aktivierte Erk1 Iso-

form ist dagegen kaum nachweisbar und wird durch die Inhibition des ETF/Tead2 Proteins nicht beeinflusst.

Die Transfektion der Kontrollduplexe (EGFP-siRNA) hatte dagegen keine Auswirkungen auf die Phosphorylierung der beiden Kinasen (Abbildung 70).

Die mit den ETF/Tead2-spezifischen siRNAs behandelten Zellen weisen im Vergleich zu den Kontrollzellen eine spindelförmigere Morphologie auf und eine erhöhte Erk1/2 Aktivierung. Der mit der Transformation einhergehende Wachstumsvorteil konnte jedoch nicht beobachtet werden. Die Hemmung der ETF/Tead2 Expression führt dagegen zu einer Inhibition des Wachstums. Für die vollständige Transformation sind somit weitere Faktoren notwendig.

3.9 siRNA Design

Die Euphorie, die mit der Nutzung der RNA Interferenz Technologie in Säugetierzellen einherging, wurde ein wenig abgeschwächt als klar wurde, dass sich nicht jedes Gen so problemlos mittels der Transfektion von siRNAs inhibieren ließ {Holen, 2002 #92}, und dass verschiedene siRNAs, die gegen die gleiche mRNA gerichtet sind, sehr in ihrer Effizienz variieren können {Holen, 2002 #92}. Zunächst wurde davon ausgegangen, dass die Tertiärstruktur der mRNA eine Rolle spielt {Holen, 2002 #92}. Die mRNA bildet Strukturen aus, die entweder für den RISC-Komplex gut oder schlecht zugänglich sind. Mittels RnaseH Behandlung wurde zunächst versucht, die gut zugänglichen Regionen der mRNA zu identifizieren und die siRNA Duplexe gegen solche Sequenzbereiche zu richten.

Erst Arbeiten der Arbeitsgruppe Tuschl konnten zeigen, dass eher die Sequenz der siRNAs an sich für die Inhibitionseffizienz entscheidend ist {Martinez, 2002 #153}. Verschiebt man die Sequenz des Duplexes relativ zur mRNA immer nur um ein Nukleotid, so unterscheiden sich die einzelnen siRNAs stark in ihrer Effizienz. Dieses Phänomen kann nicht durch Unterschiede in der Zugänglichkeit der mRNA erklärt werden, da die siRNA Duplexe gegen die gleiche Region gerichtet waren.

Im Laufe der vorliegenden Arbeit wurde eine Anzahl von Arbeiten veröffentlicht, in denen eine systematische Untersuchung der siRNA Sequenz vorgenommen wurde {Ui-Tei, 2004 #250} {Yoshinari, 2004 #278} {Pancoska, 2004 #178} {Reynolds, 2004 #196} {Hsieh, 2004 #94}. Um eine möglichst hohe Effizienz der siRNA Duplexe zu erzielen, sollten folgende Kriterien erfüllt sein {Reynolds, 2004 #196}:

- 1) Der CG-Gehalt der siRNA sollte zwischen 30 und 52% liegen
- 2) Es sollten sich 3 oder mehr A/U Basenpaare an den Positionen 15-19 des Sinnstranges befinden
- 3) Die Sequenz sollte keine internen Wiederholungen beinhalten
- 4) Es ist von Vorteil wenn sich an Position 19 des Sinnstranges ein Adenin befindet
- 5) Eine siRNA zeigt eine höhere Effizienz wenn an Position 3 des Sinnstranges ein Adenin lokalisiert ist
- 6) Ein Uracil an Position 10 des Sinnstranges erhöht die Effizienz der siRNA
- 7) Es sollte sich kein G oder C an Position 19 des Sinnstranges befinden
- 8) Ein G an Position 13 des Sinnstranges verringert die Effizienz der siRNA

Vergleicht man nun die Sequenzen, der in dieser Arbeit verwendeten siRNA Duplexe, die zu einer sehr effizienten Inhibition des Zielgens führen (z.B. gegen Mek1, Mek2, Erk1 und Erk2) mit diesen Kriterien, ist es offensichtlich dass diese siRNAs nicht alle Bedingungen erfüllen (Tabelle 7). Zusätzlich dazu wurden noch zwei siRNA Duplexe (Mek2 nf, Mek1 nf) in die Liste aufgenommen, die zu keiner Verminderung der jeweiligen Ziel-mRNA geführt haben. Dabei erfüllt der Mek2 nf Duplex nur 2 der 8 Kriterien, während der Mek1 nf in 4 Punkten übereinstimmt. Diese Kriterien können also als Richtlinien genommen werden, müssen aber nicht vollständig erfüllt sein, um einen effizienten siRNA Duplex herzustellen. Aber sie sind hilfreich, die Liste an potentiellen Duplexen gegen eine bestimmte mRNA einzuschränken.

Kriterium	Mek1	Mek1 neu	Mek2	Mek2 neu	Erk1	Erk1-1	Erk2	Erk2-2	Mek2 nf	Mek1nf
I	50%	52%	50%	47%	50%	47%	41%	43%	59%	59%
II	ja	nein	ja	ja	ja	ja	ja	nein	ja	nein
III	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja
IV	nein	ja	ja	ja	nein	nein	nein	ja	nein	ja
V	ja	nein	nein	nein	nein	nein	ja	nein	nein	nein
VI	nein	nein	ja	nein	nein	ja	nein	ja	nein	nein

VII	ja	ja	ja	ja	ja	nein	ja	ja	nein	ja
VIII	ja	nein	ja	nein	ja	nein	ja	ja	nein	ja

Tabelle 7: Vergleich der Sequenzen von 10 hier in der Arbeit verwendeten siRNA Duplexen mit den bisher publizierten Kriterien für eine funktionale siRNA.

4 Diskussion

4.1 siRNA versus Inhibitor-Spezifität kontra Effizienz: die Vor- und Nachteile unterschiedlicher Methoden der Signalweg-Hemmung

Die Ras Onkogene führen über die Aktivierung einer Reihe von Effektoren zur Transformation. Der Raf-Mek-Erk-Signaltransduktionsweg ist darunter am besten erforscht. Dabei rekrutiert Ras Raf an die Zellmembran, wo es phosphoryliert wird. Das aktivierte Raf phosphoryliert und aktiviert Mek1/2, welche wiederum die beiden Erk Kinasen phosphorylieren und aktivieren. Erk1/2 besitzen sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern eine Reihe von Substraten. Sie können durch die Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren wie z.B. Ets, Elk und Myc direkt Einfluss auf die Genexpression nehmen oder indirekt, über die Aktivierung von anderen Substraten wie z.B. der p90-RSK Kinasefamilie, die ihrerseits die Aktivität von Transkriptionsfaktoren und Histonen modifizieren können.

In vielen humanen Neoplasien findet sich eine erhöhte Aktivität des Raf-Mek-Erk-Signaltransduktionsweges. Zunächst wurde davon ausgegangen, dass diese erhöhte Aktivität hauptsächlich durch die Ras-Onkogene hervorgerufen wird. Doch mittlerweile konnten auch Mutationen der Raf Gene in humanen Neoplasien nachgewiesen werden {Davies, 2002 #47}. Gegen Raf und Mek konnten eine Anzahl von Enzyminhibitoren entwickelt werden. Der Nachteil vieler dieser Inhibitoren ist, dass sie nicht zwischen den einzelnen Kinaseisoformen unterscheiden können. Viele Raf-Inhibitoren hemmen die Aktivität aller drei Raf-Isoformen, eine funktionelle Analyse der drei Raf-Proteine ist dadurch nicht möglich. Das gleiche Problem gilt auch für die meisten Mek Inhibitoren. Zusätzlich dazu konnten für den Mek Inhibitor U0126 unspezifische Effekte nachgewiesen werden. Neben den beiden Mek Kinasen wird auch die Aktivität von Mek5 gehemmt {Kamakura, 1999 #110}.

In dieser Arbeit ist es nun das erste Mal gelungen, jede Komponente des Ras-Raf-Mek-Erk-Signaltransduktionsweges einzeln mittels RNA Interferenz effizient zu inhibieren. Im Gegensatz zu kommerziell erhältlichen Inhibitoren konnte die Rolle der verschiedenen Isoformen in der Proliferation, Morphologie und Genexpression von transformierten Zellen definiert werden.

Enzyminhibitoren binden meist an Proteindomänen, die zwischen den einzelnen Kinaseisoformen hochkonserviert sind. Die Inhibition mittels RNA Interferenz findet dagegen auf Ebe-

ne der mRNA statt. Die Sequenz der siRNA kann so gewählt werden, dass sie an nicht homologe Bereiche der mRNA bindet.

Aber wie sieht es mit der Spezifität der siRNA in Hinblick auf ihren Einsatz als Ras-Inhibitor aus? Können die siRNA Duplexe zwischen Genen unterscheiden, die sich nur in einer einzigen Base voneinander unterscheiden?

Die Ergebnisse zur Toleranz von siRNA Duplexen gegenüber Basenaustauschen sind unterschiedlich. Die stabile Transfektion von KRAS-V12 spezifischen siRNA Duplexen in CAPLAN-1 Zellen resultiert in einem fast vollständigen Verlust der Onkogen-Expression {Brummelkamp, 2002 #25}. Wird die gleiche siRNA in EJ Zellen transfiziert, die nur ein Wildtyp-KRAS Gen besitzen, verändert sich die Expression des RAS Proteins nicht {Brummelkamp, 2002 #25}. Hans Prydz und seine Mitarbeiter fanden heraus, dass die Einfügung eines zentral gelegenen Basenaustausches in einem siRNA Duplex nur einen geringen Einfluss auf die Inhibition des humanen Tissuefaktors (TF) hat {Holen, 2002 #92}. Sogar die Mutation einer zweiten Base hebt die Effizienz der siRNA nicht vollständig auf {Holen, 2002 #92}.

Auch in dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass ein einziger Basenaustausch in den gegen HRAS-V12 gerichteten siRNA Duplex nur geringe Auswirkungen auf die Inhibitionseffizienz der siRNA hat. Die Mutation liegt an Position 5 des Sinnstranges der siRNA. Trotz der widersprüchlichen Daten, die es zu der Auswirkung von Basenaustauschen auf die Inhibitionseffizienz von siRNAs gibt, ist die Tendenz zu erkennen, dass die Position der Mutation eine wichtige Rolle spielt {Amarzguioui, 2003 #7}. Basenaustausche im 5'Ende des Sinnstranges wie in dieser Arbeit verwendet, werden gut toleriert. Mutationen im 3'Ende führen dagegen zu einer starken Reduktion der Effizienz. Die starke Inhibitionseffizienz des HRAS-WT spezifischen siRNA Duplex liegt daran, dass die Mutation an Position 5 gut toleriert wird und keinen Einfluss auf den RNA Interferenz Mechanismus hat. Eine zweite Mutation führt unabhängig von deren Lokalisation zu einem vollständigen Verlust der Inhibitionseffizienz.

Es ist somit fraglich, ob die RNA Interferenz eine attraktive Alternative als Ras-Inhibitor in der Klinik darstellt. Auch DNA-Oligonukleotide wurden zur gezielten Ausschaltung der Ras-Onkogenen verwendet. Diese führten zu einem Wachstumstopp von Tumoren in Tiermodellen, allerdings wurden diese Studien nach den klinischen Studien der Phase I und II abgebrochen. Das Problem war die fehlende Spezifität der DNA-Oligonukleotide. Der Unterschied in nur einer Base zwischen Wildtyp und onkogenem Ras konnte durch die DNA-

Oligonukleotide nicht erkannt werden. Allerdings scheint die Verwendung von siRNA Duplexen in manchen Fällen vor dem gleichen Problem zu stehen. Weitere Untersuchungen sind somit notwendig, um garantieren zu können, dass ein Duplex gegen einen einzigen Basenaustausch sensitiv ist.

4.2 Neue spezifische Funktionen für einzelne Komponenten des Raf-Mek-Erk-Signaltransduktionsweges

Durch die Inhibition jeder einzelnen Komponente des Raf-Mek-Erk-Signaltransduktionsweges, konnten interessante, isoformspezifische Unterschiede zwischen den Kinasen gezeigt werden. A-Raf konnte erstmals eine antiapoptotische Rolle zugewiesen werden. Diese Hemmung der Apoptose läuft möglicherweise über einen Mek2-abhängigen Weg und ist an die Mitochondrien gekoppelt. Für die beiden Mek Kinasen konnten unterschiedliche Funktionen in der Signalweiterleitung gezeigt werden. Mek2 spielt die Hauptrolle in der Aktivierung der beiden Substratkinasen Erk1 und Erk2. Der Verlust der Mek1 Isoform wird dagegen möglicherweise durch eine erhöhte Expression von Mek2 kompensiert und wirkt sich nicht so stark auf die Phosphorylierung von Erk1/2 aus. Durch die Verwendung von Erk1 und Erk2 spezifischen siRNAs konnte eine Trennung zwischen der Proliferationsregulation und der Kontrolle der morphologischen Transformation herausgearbeitet werden. Durch die Verwendung von Microarrays ist es gelungen, beiden Phänotypen ein Genexpressionsprofil zuzuordnen. Neben Unterschieden zwischen den verschiedenen Kinaseisoformen konnten neue, potentielle Feedbacks beschrieben werden. Die Inhibition der Erk2 Isoform induziert eine verstärkte Aktivierung von Erk1. Interessanterweise resultiert der Verlust von Erk1 oder Erk2 in einer verstärkten Aktivierung der beiden Mek Kinasen. Auch auf Ebene der beiden Mek Kinasen konnte ein neuer, potentieller Rückkoppelungsmechanismus gezeigt werden. Die Inhibition von Mek2 bewirkt eine erhöhte Aktivierung von PKC-Isoformen.

4.2.1 A-Raf: weitgehend unbekannte Rolle in der Suppression der Apoptose in Ras-transformierten Zellen

Das Interesse an der Rolle der Raf-Proteine in der malignen Transformation hat in den letzten vier Jahren stark zugenommen. Bis dahin wurde angenommen, dass die verstärkte Aktivität der Raf-Kinasen ausschließlich durch die Wechselwirkung mit den Ras-Onkogenen hervor-

rufen wird. Jedoch konnten in 66% der malignen Melanome und in einem geringeren Prozentsatz auch in einem breiten Spektrum an Krebsarten somatische Mutationen im Gen für die B-Raf-Isoform nachgewiesen werden {Davies, 2002 #47}. Diese Mutationen resultieren in einer erhöhten Kinaseaktivität des B-Raf-Proteins und führen dazu, dass die Funktion von Ras, die Lokalisation von Raf an die Membran, für das Wachstum der Krebszellen nicht mehr benötigt wird {Davies, 2002 #47}. B-Raf scheint somit eine wichtige, Ras-unabhängige Rolle in der malignen Transformation zu spielen. Mutationen in A-Raf und c-Raf-1 konnten dagegen in den untersuchten Tumoren nicht gefunden werden {Davies, 2002 #47}. Ein weiteres, wichtiges Indiz für die Bedeutung von B-Raf in der Transformation humaner Melanomzelllinien ist die Inhibition des Mek-Erk-Signaltransduktionsweges durch die Applikation von B-Raf spezifischen siRNAs {Hingorani, 2003 #91}. Die Inhibition von B-Raf geht in manchen Zelllinien mit einem Wachstumsstopp, einer erhöhten Apoptoserate und einer Reversion des transformierten Phänotyps einher. Die Zellen verlieren die Fähigkeit, verankerungsunabhängig zu wachsen. Im Gegensatz dazu hat die Transfektion von c-Raf-1 spezifischen siRNA Duplexen keine Auswirkungen {Hingorani, 2003 #91}.

Die spezifische Inhibition von A-Raf zeigt überraschende Auswirkungen auf die Morphologie, Proliferation und Signalwegaktivierung in den NIH3T3-pEJ Zellen. Die Hemmung der A-Raf Isoform resultiert in einer Zellzahlreduktion von 80% und hemmt das verankerungsabhängige und das verankerungsunabhängige Wachstum. Die Aktivierung der Substratkinasen Mek1/2 und Erk1/2 wird jedoch nicht beeinflusst. Ähnliche Ergebnisse wurden in A-Raf defizienten, embryonalen Mausfibroblasten (MEFs) gewonnen {Mercer, 2002 #159}. Die Ausschaltung der A-Raf Isoform hat auch dort keinen Einfluss auf die Aktivierung von Erk1 und Erk2 und resultiert in einer erhöhten Aktivität der B-Raf und c-Raf-1 Isoformen {Mercer, 2002 #159}. Im Gegensatz zu den in NIH3T3-pEJ Zellen gewonnenen Daten, konnte in den A-Raf defizienten MEFs kein Defekt in der Proliferations- oder der Apoptoserate festgestellt werden {Mercer, 2002 #159}. Obwohl die A-Raf Isoform in einer Vielzahl von Zellen stark exprimiert wird, haben sich bisher weniger Arbeiten mit dieser Raf-Isoform befasst. Hagemann und Rapp zeigten 1999, dass A-Raf *in vitro* Ras und Mek bindet {Hagemann, 1999 #80}, Mek1/2 werden allerdings mit einer wesentlich geringeren Effizienz phosphoryliert als durch die beiden anderen Raf-Isoformen {Pritchard, 1995 #189} {Marais, 1997 #148}. Hinzu kommt, dass A-Raf Proteine, die aus mit Wachstumsfaktoren stimulierten MEFs isoliert wurden, keine nachweisbare Kinaseaktivität gegenüber Mek1 und Mek2 zeigten {Huser, 2001

#97}. Scheinbar spielt A-Raf keine Rolle in der Signalweiterleitung über die Mek-Erk-Kaskade. Bislang gibt es nur eine Arbeit, die zeigt, dass A-Raf fähig ist, Mek1 jedoch nicht Mek2 *in vitro* zu phosphorylieren {Wu, 1996 #274}. In den NIH3T3-pEJ Zellen hat A-Raf keinen Einfluss auf die Aktivierung von Mek1 und Mek2. Allerdings kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Hemmung von A-Raf nicht doch Einfluss auf nur eine Mek Isoform hat und dieser Verlust durch eine erhöhte Aktivierung der zweiten Mek Isoform aufgehoben wird. Dies könnte durch Messung der Mek1 und Mek2 Aktivierung geklärt werden. Ähnlich wie in den A-Raf defiziente MEFs könnte der Verlust der A-Raf Isoform aber auch durch eine erhöhte Aktivität von B-Raf und /oder c-Raf-1 kompensiert werden. Die simultane Inhibition von A-Raf und B-Raf weist jedoch keine additiven Effekte in Bezug auf die Aktivierung der beiden Substratkinasen Mek1 und Mek2 gegenüber den einzelnen Hemmungen auf.

Wie kommt es aber, dass A-Raf trotzdem einen so starken Einfluss auf die Proliferation der transformierten Zellen hat? Die starke Reduktion der Zellzahl und die abgerundete Form der Zellen nach Behandlung mit A-Raf spezifischen siRNA Duplexen, legt die Vermutung nahe, dass die Inhibition von A-Raf in einer erhöhten Apoptoserate resultiert. Mittels Westernblot Analyse konnte bestätigt werden, dass die Hemmung von A-Raf in einer Induktion verschiedener, in der Apoptose involvierter Proteine resultiert. Es kommt zu einer verstärkten Spaltung der Caspasen 3, 7 und 9. Die Inhibition von A-Raf scheint somit die Apoptose über einen mitochondrialen Weg zu induzieren. Bereits vor einigen Jahren wurde beobachtet, dass A-Raf unter anderem in den Mitochondrien einer Zelle lokalisiert ist {Yuryev, 2000 #279}. Dort interagiert es mit den beiden Proteinen hTIM und hTOM, die eine Rolle im mitochondrialen Transportsystem spielen und möglicherweise für den Transport von A-Raf ins Mitochondrium verantwortlich sind {Yuryev, 2000 #279}. Die räumliche Nähe von A-Raf zu den mitochondrialen Komponenten der Apoptosemaschinerie könnte eine aktive Rolle von A-Raf in der Hemmung des programmierten Zelltodes in Ras-transformierten Zellen bedeuten. Neben der Rolle in der Apoptose könnte die Lokalisation von A-Raf in den Mitochondrien ein Indiz dafür sein, dass die Raf-Mek-Erk-Kaskade nicht nur über den Zellkern die Proliferation von Zellen reguliert, sondern auch über die Regulation der Mitochondrien Einfluss auf die Zellteilung nimmt. Die Mitochondrien sind die Energielieferanten der Zelle. Sie produzieren ATP, dass für die Zellteilung und die Replikation der Mitochondrien benötigt wird. Über die Lokalisation anderer Komponenten des Raf-Mek-Erk-Signaltransduktionsweges in den Mitochondrien liegen jedoch keine Informationen vor.

Das für die A-Raf Inhibition spezifische Genexpressionsprofil (Tabelle 3, Anhang) gibt einen Hinweis darauf, dass A-Raf auch eine Rolle in der Regulation der Proliferation spielt. Gene wie z.B. Lysyloxidase, Procollagen, Sparc, Slpi, Timp3, Thrombospondin1, Hitzeschockprotein 5, Ornithinedecarboxylase, GTP Cyclohydrolase und Prionprotein spielen in der Proliferation bzw. Apoptose eine Rolle {Palamakumbura, 2004 #177}{Degiorgio-Miller, 2005 #48}{Sweetwyne, 2004 #242}{Zhang, 2002 #281}{Drynda, 2005 #55}{Bruel, 2005 #24}{Thony, 2000 #246}{Spudich, 2005 #233} und werden durch die Hemmung von A-Raf in ihrer Expression reguliert. Interessanterweise sind alle diese Gene mit Ausnahme von Slpi auch als Zielgene der Mek-Erk-Kaskade beschrieben worden {Smith-Mungo, 2002 #230}{Chaudhary, 2000 #35}{Zuber, 2000 #291}{Tchernitsa, 2004 #244}{Sengupta, 2004 #213}. Eine weitere, interessante Beobachtung ist, dass 64% der durch die Hemmung von A-Raf regulierten Gene in gleicher Weise durch die Transfektion Mek2 spezifischer siRNAs in ihrer Expression beeinflusst werden. Möglicherweise hat A-Raf wie schon vorher erwähnt, Einfluss auf eine Mek-Isoform, deren Verlust durch eine erhöhte Aktivierung der anderen Isoform kompensiert wird.

Wie die Inhibition von A-Raf resultiert auch die Hemmung von c-Raf-1 in einer Induktion der Apoptose, allerdings in einem wesentlich geringeren Ausmaß verglichen zu A-Raf. Der Weg über den c-Raf-1 seine antiapoptotische Funktion in den NIH3T3-pEJ Zellen ausübt, scheint wie bei A-Raf ein mitochondrialer Weg zu sein. Die Inhibition von c-Raf-1 hat jedoch im Gegensatz zu A-Raf keinen Einfluss auf die Caspasen 7 und 9. Möglicherweise resultiert die Hemmung von c-Raf-1 und die damit einhergehende Aktivierung von Bad anders als die A-Raf-Isoform nicht in einer Ausschüttung von Cytochrom c, sondern führt über die Aktivierung des Smac/Diablo Proteins zur Aktivierung der Caspase 3. Ähnlich wie für die A-Raf Isoform wurde bereits postuliert, dass c-Raf-1 eine wichtige, antiapoptotische Funktion hat, die an die Mitochondrien gekoppelt ist {Wang, 1996 #261}. Im Gegensatz zu A-Raf konnte c-Raf-1 jedoch nicht in den Mitochondrien lokalisiert werden {Yuryev, 2000 #279}, sondern übt seinen antiapoptotischen Funktion an der Außenmembran der Mitochondrien aus {Wang, 1996 #261}.

Auch in c-Raf-1 defizienten Mäusen konnte eine erhöhte Apoptoserate nachgewiesen werden {Huser, 2001 #97}. Die Mäuse starben am Tag E12.5-16.5 der Embryonalentwicklung und wiesen eine Unterentwicklung der Plazenta und anderer embryonaler Gewebe auf {Mikula, 2001 #160}{Huser, 2001 #97}. Da die Aktivierung der beiden Substratkinasen Erk1 und Erk2

in den Knockout-Mäusen nicht negativ beeinflusst wurde, übt c-Raf-1 seine antiapoptotische Rolle offenbar unabhängig von Mek und Erk aus {Mikula, 2001 #160} {Huser, 2001 #97}. Die Transfektion der c-Raf-1 spezifischen siRNA Duplexe hat in den NIH3T3-pEJ Zellen jedoch einen starken Effekt auf die Phosphorylierung von Mek1/2 und Erk1/2. Es kann also nicht ausgeschlossen werden, dass c-Raf-1 in diesen Zellen über einen Mek-abhängigen Weg antiapoptotisch wirkt.

Neben der Reduktion an aktiven Mek und Erk Kinasen, hat die Inhibition der c-Raf-1 Isoform einen Einfluss auf den transformierten Phänotyp der NIH3T3-pEJ Zellen. Die mit siRNA behandelten Zellen weisen eine abgeflachte Morphologie auf, revertieren aber nicht vollständig. Offenbar spielt keine der drei Raf-Isoformen eine Hauptrolle in der morphologischen Transformation, denn erst die gleichzeitige Ausschaltung zweier Raf-Isoformen, B-Raf und c-Raf-1 oder A-Raf und c-Raf-1 führt zu einer leichten Reversion des transformierten Phänotyps und hat stärkere Auswirkungen auf die Aktivierung der beiden Kinasen Erk1 und Erk2.

Die Ausschaltung von B-Raf hat verglichen mit der Hemmung von A-Raf oder c-Raf-1 in den NIH3T3-pEJ Zellen den geringsten Einfluss. Die Inhibition von B-Raf führt zu einer Zellzahlreduktion von ca. 30%. Dieses Ergebnis ist unerwartet, wenn man bedenkt, dass die Deletion des B-Raf-Gens in Mäusen embryonal letal ist und die Embryonen neben einer Wachstumschwäche eine erhöhte Apoptoserate im endothelialen Gewebe zeigen {Wojnowski, 1997 #272}. Offenbar weist B-Raf in HRAS-transformierten NIH3T3 Zellen und in Mausembryonen zelltypspezifische Unterschiede in seiner Aktivität auf. Zusätzlich könnte es in den B-Raf-defizienten Mäusen zu Anpassungsprozessen während der Embryonalentwicklung kommen, während es sich bei der Applikation der siRNAs um eine kurzfristige Inhibition der B-Raf Expression handelt. Eine weitere Möglichkeit für unterschiedliche Effekte von B-Raf liegt im Vorhandensein verschiedener B-Raf-Spleißvarianten in den jeweiligen Zelllinien. Bislang wurden 4 verschiedene B-Raf cDNAs charakterisiert, die sich in 2 alternativen Exons unterscheiden {Barnier, 1995 #16}. In den NIH3T3-pEJ Zellen wird hauptsächlich die B-Raf-Isoform exprimiert, die keines der alternativen Exons besitzt. Diese Isoform hat eine mittlere Kinase- und Transformationskapazität. Möglicherweise hat die Inhibition der B-Raf Isoform deshalb einen wesentlich geringeren Einfluss auf die Aktivierung der beiden Mek Kinasen als die Hemmung von c-Raf-1. In früheren Arbeiten wurde beschrieben, dass B-Raf hauptsächlich für die Aktivierung der Mek1/2 Kinasen in NIH3T3 Zellen verantwortlich ist {Reuter, 1995 #194}. Dabei bindet B-Raf Mek1 und Mek2, aktiviert Mek1 aber effizienter als Mek2

{Jelinek, 1994 #104}. Diese differentielle Aktivierungskapazität würde erklären, warum B-Raf zwar einen leichten Effekt auf die Aktivierung von Mek1/2 hat, jedoch nur einen geringeren Einfluss auf die Proliferation der Zellen. Die Inhibition der Mek1 Isoform hat ähnlich wie B-Raf einen geringeren Einfluss auf das Wachstum. Möglicherweise verläuft das Hauptproliferationssignal in den NIH3T3-pEJ Zellen nicht über B-Raf und Mek1. Dass die B-Raf Isoform manchmal eine zweitrangige Rolle in der Ras-vermittelten Transformation spielt, wurde bereits in der KRAS-induzierten Onkogenese von humanen Krebszellen gezeigt {Kim, 2004 #117}. Auch in B-Raf^{-/-} HEC1A Zellen konnte keine Veränderung in der Aktivierung der beiden Erk Kinasen festgestellt werden {Rajagopalan, 2002 #192}. Allerdings könnte es sich hier, ähnlich wie bei den für das B-Raf-Gen defizienten Mäusen, um einen Anpassungsprozess handeln, da die B-Raf Expression langfristig inhibiert wurde. Die Transfektion der B-Raf spezifischen siRNA resultiert in einer nur kurz andauernden Inhibition der B-Raf Expression. Möglicherweise würde die stabile Transfektion von sogenannten shRNAs („small hairpin RNAs“) auf lange Sicht beobachtet, zu ähnlichen Anpassungsprozessen führen. Die Rolle der B-Raf Isoform unterscheidet sich je nach Zelltyp und Untersuchungsansatz, so dass ein Vergleich von Daten mit Vorsicht durchzuführen ist.

4.2.2 Mek1 und Mek2: zwei unterschiedliche Kinasen mit verschiedenen Rollen in der Proliferation und Erk1,2 Stimulation

Über die Funktion der Mek1/2 Isoformen findet man eine Fülle von wissenschaftlichen Publikationen. Diese lassen sich grob in 3 Gruppe einteilen: Die Mek Funktion in der Embryonalentwicklung, in der Proliferationsregulation und in der Aktivierung der Erk Substratkinasen. Die Ausschaltung des Mek1 Gens in Mäusen führt zum Tod der Tiere im Embryonalstadium E10.5, da hier Defekte an der Plazenta vorliegen {Giroux, 1999 #73}. Im Gegensatz dazu, sind Mek2 defiziente Mäuse lebensfähig und zeigen keine Einschränkungen in ihrem Wachstum und in ihrer Entwicklung {Belanger, 2003 #18}. Für die Proliferation von Säugetierzellen wie z.B. HeLa Zellen sind dagegen beide Mek-Isoformen notwendig {Liu, 2004 #140}. Auch hinsichtlich der Aktivierung der beiden Substratkinasen Erk1 und Erk2 gibt es isoformspezifische Unterschiede zwischen Mek1 und Mek2. Mek2 ist ein wesentlich stärkerer Aktivator von Erk1/2 als Mek1 {Khokhlatchev, 1997 #115} {Ussar, 2004 #252}. Aber welche Rolle spielen die beiden Mek-Isoformen in der Transformation? Haben sie überlappende Funktionen und können somit den Verlust der anderen Isoform kompensieren? Oder besitzt

jede Isoform ganz spezifische Funktionen, die die andere Isoform nicht übernehmen kann und die sich somit in einem definierten Phänotyp äußern?

Beide Isoformen beeinflussen die Proliferation von NIH3T3-pEJ Zellen, Mek2 allerdings in einem wesentlich stärkeren Maße als Mek1. Wie bereits beschrieben, konnte auch in HeLa Zellen unter Verwendung von siRNA Duplexen für beide Mek Isoformen eine essentielle Rolle in der Proliferation beschrieben werden {Liu, 2004 #140}. Jedoch wirkt sich die Hemmung der beiden Mek Kinasen auf unterschiedliche Phasen des Zellzyklus aus. Die Inhibition von Mek1 resultiert in einer erhöhten Anzahl von Zellen in der G2-Phase, während die Ausschaltung der Mek2 Isoform zu einem G1-Arrest führt {Liu, 2004 #140}. Auch in den NIH3T3-pEJ Zellen bewirkt die Applikation von Mek2 spezifischen siRNA Duplexen einen G1-Arrest. Im Gegensatz dazu hat die Inhibition der Mek1 Isoform in den Mausfibroblasten keinen Effekt auf den Zellzyklus. Allerdings müsste diese Analyse zu einem späteren Zeitpunkt wiederholt werden, da der Einfluss der Mek1 Isoform auf die Proliferation später einsetzte als bei der Inhibition von Mek2.

Ein wichtiger Hinweis für isoformspezifische Unterschiede zwischen den beiden Mek Kinasen in Bezug auf die Regulation der Proliferation lieferte auch die Untersuchung der Cyclin D1 Expression. Die Inhibition von Mek2 resultiert in einem fast vollständigen Verlust der Cyclin D1 Expression, während die Mek1 Isoform keinen Einfluss auf die Cyclin D1 Expression zeigt. Cyclin D1 reguliert über die Phosphorylierung des Retinoblastoma Proteins (Rb) die G1-Phase des Zellzyklus. Die Mek2 Inhibition führt über die Hemmung der Cyclin D1 Expression zu einem G1-Arrest. Die in den NIH3T3-pEJ Zellen gewonnenen Daten über die Funktion der beiden Mek Kinasen in der Regulation der Proliferation lassen sich jedoch nicht verallgemeinern. In humanen Krebszelllinien beispielsweise hat die Inhibition der beiden Mek Isoformen ganz andere Auswirkungen auf den Zellzyklus und die Cyclin D1 Expression {Us-sar, 2004 #252}. Die Rolle von Mek1 und Mek2 in der Regulation der Proliferation scheint also zelltypspezifisch zu sein.

Auch in Bezug auf die Aktivierung der Substratkinasen Erk1/2 zeigen sich zwischen Mek1 und Mek2 Unterschiede. Mek1 und Mek2 phosphorylieren die beiden Kinasen Erk1 und Erk2 {Zheng, 1993 #287}{Robinson, 1996 #198}. Ob es einen Unterschied zwischen den beiden Mek Isoformen betreffend ihrer Affinität zu den beiden Substratkinasen Erk1/2 gibt, wird kontrovers diskutiert. Mek1 spielt offenbar eine wichtige Rolle bei der Weiterleitung des Raf-abhängigen, mitogenen Signals {Jelinek, 1994 #104}{Cowley, 1994 #42}{Coles, 2002

#41} {Marais, 1996 #147}. Allerdings ist Mek2 ein wesentlich stärkerer Aktivator von Erk1/2 als Mek1 {Khokhlatchev, 1997 #115} {Ussar, 2004 #252}. Weder in Mek1- noch in Mek2-defizienten Mäusen wurde aber eine Änderung der Erk1/2 Aktivität beobachtet, hier wird eine Kompensation vermutet {Giroux, 1999 #73} {Belanger, 2003 #18}.

In den NIH3T3-pEJ Zellen hat die Inhibition von Mek2 einen wesentlich größeren Effekt auf die Phosphorylierung der beiden Erk Isoformen. Da die Inhibition von Mek2 einen wesentlich stärkeren Einfluss auf die Proliferation hat und die Dauer und Amplitude der Erk1/2 Aktivierung für die Regulation des Zellwachstums von Bedeutung ist {Roovers, 2000 #199}, überrascht dieses Resultat nicht. Der Verlust der Mek1 Isoform wird dagegen durch eine leicht erhöhte Expression der Mek2 Isoform kompensiert. Die Inhibition von Mek1 hat einen geringen Einfluss auf die Aktivierung der beiden Erk Kinasen und auf das Wachstum der Zellen. Im Gegensatz zu dem Einfluss auf die Proliferation scheint bei der Aktivierung von Erk1/2 ein synergistischer Effekt zwischen den beiden Mek Isoformen zu existieren. Die gleichzeitige Ausschaltung beider Mek Isoformen führt zu der stärksten Inhibition der Erk1/2 Aktivierung. Diese Hemmung ist jedoch nicht vollständig, denn trotz des Verlustes von aktivem Mek1/2 über einen Zeitraum von 48 Stunden, ist immer noch phosphoryliertes Erk1/2 in der Zelle vorhanden.

Neben der Dauer und der Amplitude der Erk Aktivierung spielt auch die Lokalisation der Kinasen in der Zelle eine Rolle {Brunet, 1999 #26}. Wird Erk1/2 durch die beiden Mek Kinasen phosphoryliert {Payne, 1991 #185}, wandert es in den Nukleus {Chen, 1992 #36} {Gonzalez, 1993 #74} {Lenormand, 1993 #131} und aktiviert dort die Transkription einer Vielzahl von Genen durch die Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren. In ruhenden Zellen befinden sich die Kinasen Raf, Mek und Erk im Zytoplasma. Erst nach Stimulation mit Wachstumsfaktoren wandert aktives Erk in den Zellkern, um 3h später wieder in das Zytoplasma zurückzugelangen {Volmat, 2001 #258}. Diese Translokation ist ein Schlüsselereignis im Erk-Signaltransduktionsweg. Wird aktives Erk künstlich im Zytoplasma verankert und kann nicht mehr in den Zellkern gelangen, wird die DNA Replikation gestoppt {Brunet, 1999 #26}. Andererseits wird durch die forcierte Expression von aktivem Erk im Nukleus die Transformation von Zellen hervorgerufen {Robinson, 1996 #198}. Durch welchen Mechanismus aktives Erk1/2 in den Zellkern gelangt, ist noch nicht vollständig geklärt. Möglich sind eine passive Diffusion sowie ein aktiver Transport des Dimers in den Zellkern {Khokhlatchev, 1997

#115}. Die Mek1/2 Kinasen stellen bei dieser Relokalisation von Erk1/2 eine Art zytoplasmatischen Anker dar.

In den NIH3T3-pEJ Zellen wird die Menge an phosphoryliertem Erk1/2, die sich im Zytoplasma befindet, durch die Inhibition der beiden Mek Kinasen nicht beeinflusst. Eine Reduktion an aktivem Erk1/2 im Zytoplasma konnte nur bei simultaner Ausschaltung beider Mek Kinasen beobachtet werden. Beide Mek Kinasen führen also die Funktion des zytoplasmatischen Ankers aus und können vermutlich den Verlust der anderen Isoform kompensieren.

Anders verhält es sich mit dem im Zellkern lokalisierten Erk1/2. Das im Nukleus befindliche Erk1/2 reguliert über die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren unter anderem die Proliferation. Die Inhibition der Erk1 Aktivität führt zur Reduktion der Cyclin D1 Expression und zu einem G1-Arrest {Weber, 1997 #268}.

Da Mek2 einen wesentlich stärkeren Einfluss auf die Proliferation der NIH3T3-pEJ Zellen hat und zu einer starken Reduktion der Cyclin D1 Expression führt, ist es nicht überraschend, dass die Inhibition von Mek2, im Gegensatz zu Mek1, zu einem fast vollständigen Verlust an phosphoryliertem Erk1/2 im Zellkern führt. In Bezug auf die relative Menge an phosphoryliertem Erk1/2 im Zellkern konnte kein additiver Effekt der beiden Mek Isoformen beobachtet werden. Sowohl in der Regulation der Proliferation als auch in der Lokalisation von aktivem Erk1/2 im Zellkern besitzt Mek2 eine dominante Rolle. Da nur die gleichzeitige Inhibition beider Mek Isoformen einen Einfluss auf die Phosphorylierung des im Zytoplasma befindliche Erk1/2 hat und zur Reversion der transformierten Morphologie führt, könnte das ein Hinweis darauf sein, dass auch zytoplasmatische Substrate der beiden Erk Kinasen eine Rolle in der morphologischen Transformation spielen.

Die gleichzeitige Transfektion von Mek1 und Mek2 spezifischen siRNA Duplexen führt zu einem vollständigen Verlust an phosphoryliertem Mek1/2 über einen Zeitraum von mindestens 48 Stunden nach der Transfektion. Diese effiziente Inhibition der Mek1/2 Aktivität reduziert die Menge an phosphoryliertem Erk1/2 im Zellkern. Dagegen wird das aktive Erk1/2 im Zytoplasma in einem sehr viel geringeren Ausmaß beeinflusst. Wie kommt es, dass sich trotz der gleichzeitigen und langanhaltenden Hemmung beider Mek Isoformen immer noch aktives Erk im Zytoplasma befindet, jedoch nicht im Zellkern? Existiert ein Stabilitätsunterschied zwischen zytoplasmatischem und kernständigem phospho-Erk1/2? Oder existieren alternative Signaltransduktionswege, die neben den beiden Mek Kinasen zur Aktivierung von Erk1/2 führen?

Erk1/2 kann auch über einen Mek-unabhängigen Signaltransduktionweg aktiviert werden {Grammer, 1997 #76}. Die langanhaltende Aktivierung der MAPK nach Stimulation von Swiss 3T3 Fibroblasten mit PDGF wird über einen Mek-unabhängigen, aber PI(3) Kinase- und cPKC-abhängigen Weg reguliert {Grammer, 1997 #76}. Außerdem inhibieren dominant-negative Mutanten von PKC epsilon und zeta die Aktivierung von Erk1/2 durch konstitutiv-aktives c-Raf-1 oder Mek1 {Kampfer, 2001 #111}. Nach Inhibition der Mek2 Isoform in NIH3T3-pEJ Zellen konnte eine erhöhte Phosphorylierung der PKC Isoformen epsilon und alpha festgestellt werden. Möglicherweise wird der Verlust der Mek2 Kinase eher durch eine erhöhte Aktivität bestimmter PKC-Isoformen kompensiert, als durch eine verstärkte Aktivierung der Mek1 Kinase. Im Gegensatz dazu, resultiert die Inhibition von Mek1 in einer geringeren Induktion der PKC Phosphorylierung. Allerdings konnte hier auch eine erhöhte Expression der Mek2 Isoform beobachtet werden. Die Zelle scheint also auf unterschiedlichen Wegen den Verlust der beiden Mek Kinasen zu kompensieren. Werden beide Mek Isoformen gleichzeitig ausgeschaltet, so ist auch hier die Aktivierung der beiden PKC Isoformen zu erkennen, allerdings in einem geringeren Ausmaß als bei der Inhibition von Mek2. Möglicherweise läuft dieser alternative Weg größtenteils über die Mek1 Kinase und wird nur in einem geringen Ausmaß aktiviert, wenn Mek1 inhibiert wird. Ein Hinweis darauf ist die Beobachtung, dass die Aktivierung von Erk1/2 durch konstitutiv-aktives Mek1 über eine dominant-negative Mutante von PKC zeta gehemmt wird {Kampfer, 2001 #111}. Es wäre interessant zu untersuchen, in wieweit sich die gleichzeitige Inhibition von Mek2 und verschiedenen PKC-Isoformen auf die Aktivierung der Erk1/2 Kinasen im Zytoplasma, auf die Morphologie und die Proliferation der Zellen auswirkt. Zusätzlich zu PKC kann auch die PI(3) Kinase zu einer Phosphorylierung der beiden Erk Kinasen beitragen {Grammer, 1997 #76}. Im Rahmen dieser Arbeit konnte leider nicht weiter auf diesen alternativen Weg eingegangen werden.

Die Inhibition von Mek2 hat im Vergleich zu Mek1 einen wesentlich stärkeren und vor allem schnelleren Effekt auf das Zellwachstum. Da sich auch der Einfluss der beiden Isoformen auf die Aktivierung der beiden Substratkinasen Erk1 und Erk2 unterscheidet, liegt die Vermutung nahe, dass Mek1 und Mek2 die Proliferation über unterschiedliche Mechanismen regulieren. Spiegeln sich diese Unterschiede auch in einem für den jeweiligen Phänotyp spezifischen Genexpressionsprofil wieder?

Durch die Inhibition von Mek1 werden 47 Gene in ihrer Expression reguliert, während Mek2 einen Einfluss auf die Expression von 56 Genen hat. Die beiden Genexpressionsprofile über-

lappen nur in 48% der Gene. Mek2 reguliert eine Vielzahl von Genen, die in der Wachstums-kontrolle eine Rolle spielen, darunter Lysyloxidase, SST3, Pentraxin3, Timp3, Interferon gamma, Thrombospondin1, Aktin beta, Proteolipidprotein2, Clic1 und Vimentin {Li, 2003 #134} {Massa, 2004 #156} {Rusnati, 2004 #200} {Drynda, 2005 #55} {Schroder, 2004 #206} {Bruehl, 2005 #24} {Dahlen, 2004 #45} {Flanary, 2000 #64} {Novarino, 2004 #172} {Wang, 2000 #262}. Für Interferon gamma und Tap2 konnte eine Rolle in der Regulation der G1-Phase des Zellzyklus gezeigt werden {Song, 2005 #232} {Alpan, 1996 #6}. Im Gegensatz dazu, finden sich in dem für die Mek1 Isoform spezifischen Genexpressionsprofil mit Cyr 61, Marcks, Spp1 und S100a6 nur 4 Gene, für die eine Funktion in der Proliferation bereits beschrieben wurde {Sakamoto, 2004 #203} {Zhao, 2000 #285} {Crawford, 1998 #43} {Breen, 2003 #23}.

4.2.3 Erk1 und Erk2: gleichzeitige Aktivierung ist essentiell für die morphologische Transformation

Die Erk Kinasen regulieren über die Aktivierung von zytosolischen und nukleären Substraten zelluläre Prozesse wie die Proliferation, Differenzierung und Genexpression. In wieweit sich die beiden Kinasen in ihrer Substratspezifität unterscheiden, wurde bisher jedoch nicht untersucht. In dieser Arbeit ist es erstmals gelungen, isoformspezifische Unterschiede in der Regulation von Zielproteinen und der Genexpression zwischen Erk1 und Erk2 zu zeigen. Erk1 hat einen größeren Einfluss auf die Expression von Cyclin D1, auf die Aktivierung des Transkriptionsfaktors Elk-1 und der Kinasen PKC delta und epsilon. Erk2 reguliert dagegen die Aktivierung der p70S6Kinase und hat einen größeren Einfluss auf die Transkription. Die Inhibition von Erk1 reguliert 39 Gene in ihrer Expression. 57 Gene werden durch die Hemmung von Erk2 in ihrer Expression beeinflusst. Die beiden Erk Kinasen scheinen entgegen bisheriger Vermutungen unterschiedliche Funktionen zu besitzen. Außerdem ist eine Trennung von Proliferationsregulation und morphologischer Transformation gelungen. Die Inhibition einer Isoform reicht aus, um das Wachstum der Zellen zu stoppen, für die morphologische Transformation sind jedoch beide Isoformen nötig.

Ein isoformspezifischer Unterschied zwischen Erk1 und Erk2 konnte auch in der Mausentwicklung beschrieben werden. Die Ausschaltung von Erk2 resultiert in Mäusen in einer embryonalen Lethalität aufgrund von Defekten in der Entwicklung der Plazenta {Hatano, 2003 #87}. Im Gegensatz dazu sind die für das Erk1 Gen defizienten Mäuse lebensfähig, fruchtbar

und von normaler Größe, nur die Differenzierung der Thymozyten ist beeinflusst {Pages, 1999 #176}. Da die beiden Erk Isoformen als funktionell redundant gelten, könnten Unterschiede in der räumlichen und zeitlichen Expression Gründe für die verschiedenen Phänotypen sein.

Ein Unterschied in der Lokalisation zwischen Erk1 und Erk2 könnte ein Grund für die in den NIH3T3-pEJ beobachteten, isoformspezifischen Effekte sein. Erk2 hat beispielsweise keinen oder nur einen geringen Einfluss auf die zytoplasmatischen Zielproteine PKC und Cyclin D1. Dagegen werden die beiden nukleären Proteine p70S6 Kinase und p65NFκB ausschließlich durch die Inhibition von Erk2 reguliert. Bei der Regulation von zytoplasmatischen Proteinen spielt es dagegen nur eine untergeordnete Rolle. Dass die Lokalisation der Erk Kinasen einen entscheidenden Einfluss auf zelluläre Prozesse hat, konnte in PC12 Zellen gezeigt werden. Differenzieren die Zellen, so befindet sich Erk1/2 hauptsächlich im Zellkern. Werden die Zellen dagegen zum Wachstum stimuliert, befindet sich der größte Teil an aktivem Erk1/2 im Zytoplasma {Marshall, 1995 #149}. Die Lokalisation der beiden Erk Kinasen wird über eine Reihe von Proteinen wie z.B. PEA15, β-Arrestin-2 und Sef reguliert {Kolch, 2005 #123}.

Die unterschiedlichen Effekte der Erk1 und Erk2 Inhibition könnten aber auch durch verschiedene Kompensationsmechanismen hervorgerufen werden. Die Hemmung von Erk2 resultiert in einer erhöhten Erk1 Aktivierung gegenüber den Kontrollzellen. Der Verlust von Erk2 könnte also durch die Erk1 Isoform kompensiert werden. Möglicherweise ist der geringere Einfluss von Erk2 auf die Proliferation und die Aktivierung zytoplasmatischer Zielproteine durch diese Kompensation zu erklären. In den für die beiden Erk Isoformen defizienten Knockout Mäuse konnten keine erhöhten Aktivierungen der jeweils anderen Isoform beobachtet werden {Hatano, 2003 #87} {Pages, 1999 #176}. In dieser Arbeit war es nicht möglich, die durch die Inhibition der Erk Kinasen spezifischen Effekte von möglichen, kompensatorischen zu trennen.

Wie bereits erwähnt, resultiert die Inhibition von Erk2 in einer verminderten Aktivierung der p70 S6 Kinase. Die p70 S6 Kinase Aktivität wird in der KRAS-vermittelten Transformation über einen PI3K- und mTOR abhängigen Weg reguliert {Shao, 2004 #217}. Die Hemmung der p70 S6 Kinasen durch den Mek1/2 Inhibitor U0126 wurde durch eine mögliche unspezifische Bindung des Inhibitors an die p70 S6 Kinase erklärt {Fukazawa, 2000 #308}. Mittels der RNA Interferenz konnte gezeigt werden, dass eine Wechselwirkung zwischen Erk2 und der p70 S6 Kinase besteht. Neben der Regulation der Genexpression über die Aktivierung von

Transkriptionsfaktoren, hat die Erk2 Isoform möglicherweise auch Einfluss auf die Translation.

Die Inhibition von Erk1 und Erk2 resultiert in einer Wachstumshemmung, hat aber nur einen geringen Einfluss auf die Morphologie der Zellen. Nur die gleichzeitige Ausschaltung beider Erk Kinasen führt zur morphologischen Reversion der NIH3T3-pEJ Zellen. Für therapeutische Ansätze ist es daher wichtig, Inhibitoren zu entwickeln, die beide Erk Isoformen hemmen. Nur die gleichzeitige Ausschaltung beider Erk Isoformen kann Tumorzellen effizient bekämpfen.

4.3 Charakterisierung von potentiellen Kandidatengen, die in der Ras-vermittelten morphologischen Transformation eine Rolle spielen

Eine vollständige morphologische Reversion der NIH3T3-pEJ Zellen wurde nicht nur durch siRNA vermittelte Hemmung von Erk1/2, sondern auch nach gleichzeitiger Hemmung von Mek1/2 über siRNA und den Inhibitor U0126 erreicht. In Tabelle 4 sind alle Gene aufgelistet, die durch alle drei Behandlungen in gleicher Weise in ihrer Expression reguliert werden. Eine Reihe dieser Gene konnte bereits in früheren Arbeiten als für die Transformation relevant beschrieben werden. Die Lysyloxidase hemmt die Ras-vermittelte Transformation, in dem es die Aktivierung von NFκB verhindert {Jeay, 2003 #103}. Durch die Regulation von wachstumsassoziierten Proteinen hemmt es die Tumorprogression und Metastasierung {Zhang, 2002 #281}. Ein negativer Einfluss auf die onkogene Transformation konnte auch für Colla2 beschrieben werden {Andreu, 1998 #8}. Pmp22, SST3, Ltbp2, Ccnd1, Odc, Mrg1, CtsL und Plf wurden ebenfalls tumorigene bzw. proliferative Funktionen zugeschrieben {Karlsson, 1999 #112} {Massa, 2004 #156} {Hyytiainen, 2003 #99} {Li, 2003 #135} {Nemoto, 2002 #168} {Sun, 1998 #240} {Reinheckel, 2005 #193} {Parfett, 1992 #182}.

Bisher ist weitgehend unklar, ob alle Gene eines solchen Clusters für die Transformation essentiell sind oder ob wenige „Major players“ zentrale Funktionen innehaben. Für eine solche Analyse müssten in aufwendigen Experimenten alle Zielgene einzeln ausgeschaltet werden. Im Rahmen dieser Arbeit konnte dies nur für zwei Gene durchgeführt werden. Für Cyclin D1 und die Ornithinedecarboxylase konnte eine Rolle in der Wachstumsregulation bereits be-

schrieben werden {Shantz, 1994 #216} {Li, 2003 #135}. Die Hemmung beider Gene resultiert in den NIH3T3-pEJ Zellen in einer starken Zellzahlreduktion, hat allerdings keinen Einfluss auf die Morphologie der Zellen. Auch hier ist also wie bei der Hemmung von Erk1 und Erk2 eine Entkoppelung von morphologischer Transformation und Proliferation zu beobachten. Es wäre interessant, auch den Rest der Gene in Tabelle 5 auf ihre Funktion in den NIH3T3-pEJ Zellen mittels RNA Interferenz zu untersuchen. Da man einen klaren Effekt erwartet, nämlich die Reversion des transformierten Phänotypen, könnten diese Untersuchungen in einem Hochdurchsatzverfahren z.B. in 96 Loch-Platten durchgeführt werden. Eine andere Methode wären zellbasierte Mikroarrays. Zunächst für die Transfektion von Plasmid-DNA entwickelt {Ziauddin, 2001 #289} {Baghdoyan, 2004 #14}, können sie auch für die Applikation von siRNA genutzt werden {Kumar, 2003 #125} {Mousses, 2003 #164} {Silva, 2004 #225} {Vanhecke, 2004 #255}. Die zu transfizierende RNA oder DNA wird in einer Gelatine-lösung auf die Arrays gespottet. Die Gelatine erleichtert den späteren Transport der siRNA oder DNA in die Zellen {Vanhecke, 2004 #255}. Die zu transfizierenden Zellen werden dann zusammen mit dem jeweiligen Transfektionsreagenz auf dem Array inkubiert. Bei den in Tabelle 4 aufgelisteten Kandidatengenen würde die Auswertung anhand der Morphologie erfolgen. So könnte man untersuchen, ob die Hemmung einzelner Gene eine vollständige Reversion hervorrufen kann.

Zusätzlich zu der Inhibition durch siRNAs wurde der Mek/Erk-Signaltransduktionsweg durch die Applikation des Mek1/2 Inhibitors U0126 gehemmt. Die Hemmung der Mek Kinasen durch U0126 hat den größten Einfluss auf die Genexpression. 90 Gene werden in ihrer Expression durch die Applikation von U0126 reguliert. Eine Reihe dieser Gene wird nur durch den Inhibitor reguliert, während die Hemmung durch siRNAs keinen Einfluss auf ihre Expression hat. U0126 ist ein sehr potenter Mek1/2 Inhibitor, jedoch konnten auch zusätzliche Zielproteine bei seinem Einsatz beschrieben werden. Neben der Phosphorylierung von Erk1/2, wird auch die Aktivität der Erk5 Kinase negativ beeinflusst. Gene, die ausschließlich durch den Mek1/2 Inhibitor, nicht jedoch durch Mek1/2 siRNA reguliert werden, könnten potentielle Zielgene der Erk5 Kinase darstellen (Tabelle 6). Für Fbln5, Cxcl5, Cyr61, Wisp2 und Pitx1 konnte eine Rolle in der Tumorentstehung beschrieben werden {Nishiu, 2002 #170} {Arenberg, 1998 #11} {Jin, 2005 #105} {Cervello, 2004 #34} {Kolfshoten, 2005 #124}. Keines dieser Gene konnte bisher allerdings als Erk5-Zielgen identifiziert werden.

Unter den 145 Genen, die als differentiell exprimiert identifiziert wurden, sind 16 Gene, die weder durch den PI3Kinase- noch durch den Erk-Signaltransduktionsweg in ihrer Expression reguliert werden. Unter diesen Genen befinden sich potentielle, für die Wachstumskontrolle und die Tumorprogression wichtige Kandidatengene. Beispielsweise wirkt das carboxyterminale Ende von Adamts1 dem Metastasierungspotential von experimentellen Tumoren entgegen {Kuno, 2004 #126}. Dagegen wurde Syndecan in Brustzellen als wachstumsfördernd beschrieben {Maeda, 2004 #144}, während Cxcl12 wichtig für die Metastasierung von Tumoren ist {Zlotnik, 2004 #290}. Bei diesen Genen könnte es sich um potentielle Zielgene des RalGDS-Signaltransduktionsweges handeln.

4.4 Fra-1 spielt eine wichtige Rolle in der Regulation der Proliferation

Die Inhibition des Transkriptionsfaktors Fra-1 führt in den Rose A2/5 Zellen zu einer starken Zellzahlreduktion, allerdings weisen die Zellen immer noch ihr transformiertes Aussehen auf. Eine erhöhte Expression von Fra-1 in Tumoren wurde bereits beschrieben {Risse-Hackl, 1998 #197} {Zajchowski, 2001 #280}. Fra-1 zählt zu der Familie der Fos-Proteine, die eine Komponente des AP-1 Transkriptionsfaktors darstellen. AP-1 ist ein Homo- oder Heterodimer aus Mitgliedern der Jun, Fos, ATF und MAF Protein Familien, dessen Aktivität mit Proliferation, Differenzierung und Apoptose assoziiert ist {Lallemand, 1997 #128} {Chinenov, 2001 #38} {Jochum, 2001 #106} {Passegue, 2000 #183} {Shaulian, 2001 #220}. Die Aktivität von AP-1 wird sowohl durch die Proteinmenge als auch über posttranslationale Modifikationen gesteuert. Je nachdem aus welchen Komponenten sich der AP-1 Komplex zusammensetzt, wird er durch unterschiedliche Signaltransduktionswege in seiner Aktivität reguliert und bindet an unterschiedliche DNA-Sequenzelemente. Die Expression von Cyclin D1, Cyclin A, p53 und p16^{INK4a} wird durch AP-1 kontrolliert {Bakiri, 2000 #15} {Wisdom, 1999 #271}.

Fra-1 besitzt die gleiche DNA-bindende Domäne wie die anderen Mitglieder der Fosproteinfamilie, hat jedoch keine transaktivierende Domäne. Die erhöhte Expression von Fra-1 könnte die Komposition der aktiven AP-1 Komplexe zu Fra-1/c-Jun Heterodimeren verschieben, so dass eine Abschwächung der Fos-regulierten Genexpression die Folge ist {Kessler, 1999 #114}. Die Inhibition der Fra-1 Expression hat allerdings im Vergleich zur Hemmung des KRAS-Onkogens einen geringeren Einfluss auf die Proliferation. Fra-1 wird für die Prolifera-

tion der Rose A2/5 Zellen benötigt, jedoch scheinen noch weitere Komponenten in die Regulation mit einzuspielen.

Die Expression von EI24 wird durch p53 reguliert {Lehar, 1996 #130}. Gentransferexperimente zeigten tumorsupprimierende Eigenschaften von EI24, indem es bei Überexpression Apoptose induziert {Gu, 2000 #79}. Konnte EI24 in FE-8 Zellen als ein durch die HRAS-Transformation supprimiertes Gen isoliert werden {Zuber, 2000 #291}, wird es in den Rose A2/5 Zellen interessanterweise in seiner Expression aktiviert {Tchernitsa, 2004 #244}. EI24 könnte abhängig vom zellulären Kontext unterschiedliche Funktionen besitzen. Möglicherweise spielt EI24 in der Zellzyklusregulation eine Rolle und ist deswegen zeitweilig hoch exprimiert {Gu, 2000 #79}. Die Inhibition von EI24 in den Rose A2/5 Zellen zeigt jedoch keinen Effekt auf die Proliferation. Da EI24 durch p53 reguliert wird, wäre es interessant, die Ausschaltung von EI24 zu untersuchen, wenn man die Zellen einem gewissen Stress z.B. Bestrahlung aussetzt.

Die Inhibition des transkriptionellen Koaktivators p105 hat dagegen negative Auswirkungen auf die Proliferation der FE-8 Zellen. P105 ist ein Mitglied der NFκB-Familie, die unter anderem eine Rolle in der Regulation des Zellzyklus spielt und durch verschiedene Onkogene wie z.B. Ras oder Rac aktiviert wird {Joyce, 2001 #108}. Offenbar wird durch die Inhibition von p105 das Wachstum der FE-8 Zellen verlangsamt, da keine apoptotischen Zellen beobachtet werden konnten. Obwohl die Inhibition von p105 keine Auswirkungen auf die Morphologie der FE-8 Zellen hat, scheint es trotzdem für die Proliferation der Zellen notwendig zu sein. Interessanterweise konnte eine erhöhte p105 Expression in Melanomzelllinien gefunden werden {McNulty, 2001 #158}, so dass p105 vielleicht auch als mögliches therapeutisches Target für die Therapie von Hautkrebs dienen könnte.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass p105 in den FE-8 Zellen und Fra-1 in den Rose A2/5 Zellen für die Proliferation der Zellen wichtig sind. Da es sich bei Fra-1 um einen Transkriptionsfaktor handelt, wäre es interessant, die mit der Ausschaltung von Fra-1 einhergehenden transkriptionellen Veränderungen zu untersuchen. Es bleibt außerdem zu überprüfen, ob die gleichzeitige Inhibition mehrerer Kandidatengene zu einer vollständigen Reversion des transformierten Phänotyps führt.

Neben den durch die Ras Transformation in ihrer Expression induzierten Genen, gibt es eine Vielzahl von Genen, die durch das konstitutive Ras in ihrer Expression supprimiert werden. Exemplarisch wurde der Transkriptionsfaktor ETF/Tea2 analysiert. In den Rose199 und den

208F Zellen ist ETF/Tead2 gegenüber den Ras-transformierten Zellen aktiviert. Die Inhibition von ETF/Tead2 verändert die Morphologie der 208F Zellen in Richtung transformiertem Phänotyp, induziert jedoch nicht den damit verbundenen Wachstumsvorteil. Interessanterweise resultiert die Hemmung von ETF/Tead2 in einer erhöhten Phosphorylierung der beiden Erk Kinasen Erk1/2. Während die Inhibition einer Erk Isoform ausreicht, um einen vollständigen Wachstumsstopp zu induzieren, scheint das umgekehrt nicht zu funktionieren. Eine mögliche Erklärung für den starken Einfluss der ETF/Tead2-Inhibition auf die Proliferation, könnte eine Induktion des p53 Proteins sein. Die durch den Transkriptionsfaktor p53 regulierten Gene führen dann zur Induktion der Apoptose oder zum Zellzyklusarrest {Levine, 1993 #132} {Gottlieb, 1996 #75} {Ko, 1996 #118}.

Literaturverzeichnis

- Abraham, D.; Podar, K.; Pacher, M.; Kubicek, M.; Welzel, N.; Hemmings, B. A.; Dilworth, S. M.; Mischak, H.; Kolch, W. and Baccarini, M. (2000): Raf-1-associated protein phosphatase 2A as a positive regulator of kinase activation, *J Biol Chem* (vol. 275), No. 29, pp. 22300-4. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10801873
- Adam, L.; Vadlamudi, R.; Kondapaka, S. B.; Chernoff, J.; Mendelsohn, J. and Kumar, R. (1998): Heregulin regulates cytoskeletal reorganization and cell migration through the p21-activated kinase-1 via phosphatidylinositol-3 kinase, *J Biol Chem* (vol. 273), No. 43, pp. 28238-46. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9774445
- Adams, A. T. and Auersperg, N. (1985): A cell line, ROSE 199, derived from normal rat ovarian surface epithelium, *Exp Cell Biol* (vol. 53), No. 4, pp. 181-8. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=4029476
- Agami, R. and Bernards, R. (2000): Distinct initiation and maintenance mechanisms cooperate to induce G1 cell cycle arrest in response to DNA damage, *Cell* (vol. 102), No. 1, pp. 55-66. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10929713
- Alpan, R. S.; Zhang, M. and Pardee, A. B. (1996): Cell cycle-dependent expression of TAP1, TAP2, and HLA-B27 messenger RNAs in a human breast cancer cell line, *Cancer Res* (vol. 56), No. 19, pp. 4358-61. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8813124
- Amarzguioui, M.; Holen, T.; Babaie, E. and Prydz, H. (2003): Tolerance for mutations and chemical modifications in a siRNA, *Nucleic Acids Res* (vol. 31), No. 2, pp. 589-95. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12527766
- Andreu, T.; Beckers, T.; Thoenes, E.; Hilgard, P. and von Melchner, H. (1998): Gene trapping identifies inhibitors of oncogenic transformation. The tissue inhibitor of metalloproteinases-3 (TIMP3) and collagen type I alpha2 (COL1A2) are epidermal growth factor-regulated growth repressors, *J Biol Chem* (vol. 273), No. 22, pp. 13848-54. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9593730
- Aoki, K.; Yoshida, T.; Sugimura, T. and Terada, M. (1995): Liposome-mediated in vivo gene transfer of antisense K-ras construct inhibits pancreatic tumor dissemination in the

- murine peritoneal cavity, *Cancer Res* (vol. 55), No. 17, pp. 3810-6. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7641198
- Aoyama, A. and Klemenz, R. (1993): Oncogene-mediated effects on cellular gene expression, *Crit Rev Oncog* (vol. 4), No. 1, pp. 53-94. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8380052
- Arenberg, D. A.; Keane, M. P.; DiGiovine, B.; Kunkel, S. L.; Morris, S. B.; Xue, Y. Y.; Burdick, M. D.; Glass, M. C.; Iannettoni, M. D. and Strieter, R. M. (1998): Epithelial-neutrophil activating peptide (ENA-78) is an important angiogenic factor in non-small cell lung cancer, *J Clin Invest* (vol. 102), No. 3, pp. 465-72. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9691082
- Augenlicht, L. H.; Wahrman, M. Z.; Halsey, H.; Anderson, L.; Taylor, J. and Lipkin, M. (1987): Expression of cloned sequences in biopsies of human colonic tissue and in colonic carcinoma cells induced to differentiate in vitro, *Cancer Res* (vol. 47), No. 22, pp. 6017-21. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3664505
- Avruch, J.; Zhang, X. F. and Kyriakis, J. M. (1994): Raf meets Ras: completing the framework of a signal transduction pathway, *Trends Biochem Sci* (vol. 19), No. 7, pp. 279-83. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8048167
- Baghdoyan, S.; Roupioz, Y.; Pitaval, A.; Castel, D.; Khomyakova, E.; Papine, A.; Soussaline, F. and Gidrol, X. (2004): Quantitative analysis of highly parallel transfection in cell microarrays, *Nucleic Acids Res* (vol. 32), No. 9, p. e77. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15155824
- Bakiri, L.; Lallemand, D.; Bossy-Wetzel, E. and Yaniv, M. (2000): Cell cycle-dependent variations in c-Jun and JunB phosphorylation: a role in the control of cyclin D1 expression, *EMBO J* (vol. 19), No. 9, pp. 2056-68. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10790372
- Barbacid, M. (1987): ras genes, *Annu Rev Biochem* (vol. 56), pp. 779-827. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3304147
- Barnier, J. V.; Papin, C.; Eyche, A.; Lecoq, O. and Calothy, G. (1995): The mouse B-raf gene encodes multiple protein isoforms with tissue-specific expression, *J Biol Chem* (vol. 270), No. 40, pp. 23381-9. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7559496
- Baulcombe, D. (1999): Viruses and gene silencing in plants, *Arch Virol Suppl* (vol. 15), pp. 189-201. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10470279

- Belanger, L. F.; Roy, S.; Tremblay, M.; Brott, B.; Steff, A. M.; Mourad, W.; Hugo, P.; Erikson, R. and Charron, J. (2003): Mek2 is dispensable for mouse growth and development, *Mol Cell Biol* (vol. 23), No. 14, pp. 4778-87. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12832465
- Bos, J. L. (1989): ras oncogenes in human cancer: a review, *Cancer Res* (vol. 49), No. 17, pp. 4682-9. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2547513
- Boulton, T. G. and Cobb, M. H. (1991): Identification of multiple extracellular signal-regulated kinases (ERKs) with antipeptide antibodies, *Cell Regul* (vol. 2), No. 5, pp. 357-71. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1654126
- Boulton, T. G.; Nye, S. H.; Robbins, D. J.; Ip, N. Y.; Radziejewska, E.; Morgenbesser, S. D.; DePinho, R. A.; Panayotatos, N.; Cobb, M. H. and Yancopoulos, G. D. (1991): ERKs: a family of protein-serine/threonine kinases that are activated and tyrosine phosphorylated in response to insulin and NGF, *Cell* (vol. 65), No. 4, pp. 663-75. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2032290
- Bourne, H. R.; Sanders, D. A. and McCormick, F. (1990): The GTPase superfamily: a conserved switch for diverse cell functions, *Nature* (vol. 348), No. 6297, pp. 125-32. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2122258
- Breen, E. C. and Tang, K. (2003): Calcyclin (S100A6) regulates pulmonary fibroblast proliferation, morphology, and cytoskeletal organization in vitro, *J Cell Biochem* (vol. 88), No. 4, pp. 848-54. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12577318
- Bruel, A.; Touhami-Carrier, M.; Thomaidis, A. and Legrand, C. (2005): Thrombospondin-1 (TSP-1) and TSP-1-derived heparin-binding peptides induce promyelocytic leukemia cell differentiation and apoptosis, *Anticancer Res* (vol. 25), No. 2A, pp. 757-64. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15868907
- Brummelkamp, T. R.; Bernards, R. and Agami, R. (2002): Stable suppression of tumorigenicity by virus-mediated RNA interference, *Cancer Cell* (vol. 2), No. 3, pp. 243-7. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12242156
- Brunet, A.; Roux, D.; Lenormand, P.; Dowd, S.; Keyse, S. and Pouyssegur, J. (1999): Nuclear translocation of p42/p44 mitogen-activated protein kinase is required for growth factor-induced gene expression and cell cycle entry, *EMBO J* (vol. 18), No. 3, pp. 664-74. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9927426
- Burden, S. and Yarden, Y. (1997): Neuregulins and their receptors: a versatile signaling

- module in organogenesis and oncogenesis, *Neuron* (vol. 18), No. 6, pp. 847-55. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9208852
- Bustin, M. (1999): Regulation of DNA-dependent activities by the functional motifs of the high-mobility-group chromosomal proteins, *Mol Cell Biol* (vol. 19), No. 8, pp. 5237-46. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10409715
- Bustin, M. and Reeves, R. (1996): High-mobility-group chromosomal proteins: architectural components that facilitate chromatin function, *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* (vol. 54), pp. 35-100. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8768072
- Campbell, S. L.; Khosravi-Far, R.; Rossman, K. L.; Clark, G. J. and Der, C. J. (1998): Increasing complexity of Ras signaling, *Oncogene* (vol. 17), No. 11 Reviews, pp. 1395-413. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9779987
- Caplen, N. J.; Zheng, Z.; Falgout, B. and Morgan, R. A. (2002): Inhibition of viral gene expression and replication in mosquito cells by dsRNA-triggered RNA interference, *Mol Ther* (vol. 6), No. 2, pp. 243-51. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12161191
- Castells, A.; Puig, P.; Mora, J.; Boadas, J.; Boix, L.; Urgell, E.; Sole, M.; Capella, G.; Lluís, F.; Fernandez-Cruz, L.; Navarro, S. and Farre, A. (1999): K-ras mutations in DNA extracted from the plasma of patients with pancreatic carcinoma: diagnostic utility and prognostic significance, *J Clin Oncol* (vol. 17), No. 2, pp. 578-84. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10080602
- Catling, A. D.; Reuter, C. W.; Cox, M. E.; Parsons, S. J. and Weber, M. J. (1994): Partial purification of a mitogen-activated protein kinase activator from bovine brain. Identification as B-Raf or a B-Raf-associated activity, *J Biol Chem* (vol. 269), No. 47, pp. 30014-21. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7962002
- Cervello, M.; Giannitrapani, L.; Labbozzetta, M.; Notarbartolo, M.; D'Alessandro, N.; Lampiasi, N.; Azzolina, A. and Montalto, G. (2004): Expression of WISPs and of their novel alternative variants in human hepatocellular carcinoma cells, *Ann N Y Acad Sci* (vol. 1028), pp. 432-9. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15650268
- Chaudhary, L. R. and Avioli, L. V. (2000): Extracellular-signal regulated kinase signaling pathway mediates downregulation of type I procollagen gene expression by FGF-2, PDGF-BB, and okadaic acid in osteoblastic cells, *J Cell Biochem* (vol. 76), No. 3, pp. 354-9. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10780602

- tion&list_uids=10649432
- Chen, R. H.; Sarnecki, C. and Blenis, J. (1992): Nuclear localization and regulation of erk- and rsk-encoded protein kinases, *Mol Cell Biol* (vol. 12), No. 3, pp. 915-27. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1545823
- Chin, L.; Tam, A.; Pomerantz, J.; Wong, M.; Holash, J.; Bardeesy, N.; Shen, Q.; O'Hagan, R.; Pantginis, J.; Zhou, H.; Horner, J. W., 2nd; Cordon-Cardo, C.; Yancopoulos, G. D. and DePinho, R. A. (1999): Essential role for oncogenic Ras in tumour maintenance, *Nature* (vol. 400), No. 6743, pp. 468-72. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10440378
- Chinenov, Y. and Kerppola, T. K. (2001): Close encounters of many kinds: Fos-Jun interactions that mediate transcription regulatory specificity, *Oncogene* (vol. 20), No. 19, pp. 2438-52. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11402339
- Chong, H.; Lee, J. and Guan, K. L. (2001): Positive and negative regulation of Raf kinase activity and function by phosphorylation, *EMBO J* (vol. 20), No. 14, pp. 3716-27. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11447113
- Clair, T.; Miller, W. R. and Cho-Chung, Y. S. (1987): Prognostic significance of the expression of a ras protein with a molecular weight of 21,000 by human breast cancer, *Cancer Res* (vol. 47), No. 20, pp. 5290-3. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3308076
- Coles, L. C. and Shaw, P. E. (2002): PAK1 primes MEK1 for phosphorylation by Raf-1 kinase during cross-cascade activation of the ERK pathway, *Oncogene* (vol. 21), No. 14, pp. 2236-44. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11948406
- Cowley, S.; Paterson, H.; Kemp, P. and Marshall, C. J. (1994): Activation of MAP kinase kinase is necessary and sufficient for PC12 differentiation and for transformation of NIH 3T3 cells, *Cell* (vol. 77), No. 6, pp. 841-52. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7911739
- Crawford, H. C.; Matrisian, L. M. and Liaw, L. (1998): Distinct roles of osteopontin in host defense activity and tumor survival during squamous cell carcinoma progression in vivo, *Cancer Res* (vol. 58), No. 22, pp. 5206-15. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9823334
- Crespo, P. and Leon, J. (2000): Ras proteins in the control of the cell cycle and cell differentiation, *Cell Mol Life Sci* (vol. 57), No. 11, pp. 1613-36. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11092455
- Dahlen, A.; Fletcher, C. D.; Mertens, F.; Fletcher, J. A.; Perez-Atayde, A. R.; Hicks, M. J.;

- Debiec-Rychter, M.; Sciort, R.; Wejde, J.; Wedin, R.; Mandahl, N. and Panagopoulos, I. (2004): Activation of the GLI oncogene through fusion with the beta-actin gene (ACTB) in a group of distinctive pericytic neoplasms: pericytoma with t(7;12), *Am J Pathol* (vol. 164), No. 5, pp. 1645-53. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15111311
- Daum, G.; Eisenmann-Tappe, I.; Fries, H. W.; Troppmair, J. and Rapp, U. R. (1994): The ins and outs of Raf kinases, *Trends Biochem Sci* (vol. 19), No. 11, pp. 474-80. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7855890
- Davies, H.; Bignell, G. R.; Cox, C.; Stephens, P.; Edkins, S.; Clegg, S.; Teague, J.; Woffendin, H.; Garnett, M. J.; Bottomley, W.; Davis, N.; Dicks, E.; Ewing, R.; Floyd, Y.; Gray, K.; Hall, S.; Hawes, R.; Hughes, J.; Kosmidou, V.; Menzies, A.; Mould, C.; Parker, A.; Stevens, C.; Watt, S.; Hooper, S.; Wilson, R.; Jayatilake, H.; Gusterson, B. A.; Cooper, C.; Shipley, J.; Hargrave, D.; Pritchard-Jones, K.; Maitland, N.; Chenevix-Trench, G.; Riggins, G. J.; Bigner, D. D.; Palmieri, G.; Cossu, A.; Flanagan, A.; Nicholson, A.; Ho, J. W.; Leung, S. Y.; Yuen, S. T.; Weber, B. L.; Seigler, H. F.; Darrow, T. L.; Patterson, H.; Marais, R.; Marshall, C. J.; Wooster, R.; Stratton, M. R. and Futreal, P. A. (2002): Mutations of the BRAF gene in human cancer, *Nature* (vol. 417), No. 6892, pp. 949-54. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12068308
- De Vouge, M. W. and Mukherjee, B. B. (1992): Transformation of normal rat kidney cells by v-K-ras enhances expression of transin 2 and an S-100-related calcium-binding protein, *Oncogene* (vol. 7), No. 1, pp. 109-19. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1741158
- Degiorgio-Miller, A. M.; Treharne, L. J.; McAnulty, R. J.; Coleridge Smith, P. D.; Laurent, G. J. and Herrick, S. E. (2005): Procollagen type I gene expression and cell proliferation are increased in lipodermatosclerosis, *Br J Dermatol* (vol. 152), No. 2, pp. 242-9. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15727634
- Dent, P.; Haser, W.; Haystead, T. A.; Vincent, L. A.; Roberts, T. M. and Sturgill, T. W. (1992): Activation of mitogen-activated protein kinase kinase by v-Raf in NIH 3T3 cells and in vitro, *Science* (vol. 257), No. 5075, pp. 1404-7. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1326789
- Dhillon, A. S.; Meikle, S.; Yazici, Z.; Eulitz, M. and Kolch, W. (2002): Regulation of Raf-1 activation and signalling by dephosphorylation, *EMBO J* (vol. 21), No. 1-2, pp. 64-71. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11782426
- Diatchenko, L.; Lau, Y. F.; Campbell, A. P.; Chenchik, A.; Moqadam, F.; Huang, B.; Lukyanov, S.; Lukyanov, K.; Gurskaya, N.; Sverdlov, E. D. and Siebert, P. D. (1996): Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or

- tissue-specific cDNA probes and libraries, *Proc Natl Acad Sci U S A* (vol. 93), No. 12, pp. 6025-30. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8650213
- Downward, J. (1998): Ras signalling and apoptosis, *Curr Opin Genet Dev* (vol. 8), No. 1, pp. 49-54. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9529605
- Drayton, S.; Rowe, J.; Jones, R.; Vatcheva, R.; Cuthbert-Heavens, D.; Marshall, J.; Fried, M. and Peters, G. (2003): Tumor suppressor p16INK4a determines sensitivity of human cells to transformation by cooperating cellular oncogenes, *Cancer Cell* (vol. 4), No. 4, pp. 301-10. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14585357
- Drynda, A.; Quax, P. H.; Neumann, M.; van der Laan, W. H.; Pap, G.; Drynda, S.; Meinecke, I.; Kekow, J.; Neumann, W.; Huizinga, T. W.; Naumann, M.; Konig, W. and Pap, T. (2005): Gene transfer of tissue inhibitor of metalloproteinases-3 reverses the inhibitory effects of TNF-alpha on Fas-induced apoptosis in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts, *J Immunol* (vol. 174), No. 10, pp. 6524-31. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15879156
- Dykxhoorn, D. M.; Novina, C. D. and Sharp, P. A. (2003): Killing the messenger: short RNAs that silence gene expression, *Nat Rev Mol Cell Biol* (vol. 4), No. 6, pp. 457-67. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12778125
- Ehrhardt, A.; Ehrhardt, G. R.; Guo, X. and Schrader, J. W. (2002): Ras and relatives--job sharing and networking keep an old family together, *Exp Hematol* (vol. 30), No. 10, pp. 1089-106. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12384139
- Elbashir, S. M.; Harborth, J.; Lendeckel, W.; Yalcin, A.; Weber, K. and Tuschl, T. (2001): Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells, *Nature* (vol. 411), No. 6836, pp. 494-8. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11373684
- Esteller, M.; Gonzalez, S.; Risques, R. A.; Marcuello, E.; Manges, R.; Germa, J. R.; Herman, J. G.; Capella, G. and Peinado, M. A. (2001): K-ras and p16 aberrations confer poor prognosis in human colorectal cancer, *J Clin Oncol* (vol. 19), No. 2, pp. 299-304. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11208819
- Fabian, J. R.; Daar, I. O. and Morrison, D. K. (1993): Critical tyrosine residues regulate the enzymatic and biological activity of Raf-1 kinase, *Mol Cell Biol* (vol. 13), No. 11, pp. 7170-9. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7692235

- Falvo, J. V.; Thanos, D. and Maniatis, T. (1995): Reversal of intrinsic DNA bends in the IFN beta gene enhancer by transcription factors and the architectural protein HMG I(Y), *Cell* (vol. 83), No. 7, pp. 1101-11. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8548798
- Farrar, M. A.; Alberol, Ila and Perlmutter, R. M. (1996): Activation of the Raf-1 kinase cascade by coumermycin-induced dimerization, *Nature* (vol. 383), No. 6596, pp. 178-81. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8774884
- Farrar, M. A.; Tian, J. and Perlmutter, R. M. (2000): Membrane localization of Raf assists engagement of downstream effectors, *J Biol Chem* (vol. 275), No. 40, pp. 31318-24. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10913130
- Flanary, P. L.; DiBello, P. R.; Estrada, P. and Dohlman, H. G. (2000): Functional analysis of Plp1 and Plp2, two homologues of phosducin in yeast, *J Biol Chem* (vol. 275), No. 24, pp. 18462-9. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10749875
- Force, T.; Bonventre, J. V.; Heidecker, G.; Rapp, U.; Avruch, J. and Kyriakis, J. M. (1994): Enzymatic characteristics of the c-Raf-1 protein kinase, *Proc Natl Acad Sci U S A* (vol. 91), No. 4, pp. 1270-4. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8108400
- Foulds, L. (1954): The experimental study of tumor progression: a review, *Cancer Res* (vol. 14), No. 5, pp. 327-39. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=13160960
- Fujita, J.; Yoshida, O.; Yuasa, Y.; Rhim, J. S.; Hatanaka, M. and Aaronson, S. A. (1984): Ha-ras oncogenes are activated by somatic alterations in human urinary tract tumours, *Nature* (vol. 309), No. 5967, pp. 464-6. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=6328318
- Fukazawa, H. and Uehara, Y. (2000): U0126 reverses Ki-ras-mediated transformation by blocking both mitogen-activated protein kinase and p70 S6 kinase pathways, *Cancer Res* (vol. 60), No. 8, pp. 2104-7. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10786668
- Fukunaga, R. and Hunter, T. (1997): MNK1, a new MAP kinase-activated protein kinase, isolated by a novel expression screening method for identifying protein kinase substrates, *EMBO J* (vol. 16), No. 8, pp. 1921-33. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9155018
- Gavin, A. C. and Nebreda, A. R. (1999): A MAP kinase docking site is required for phosphorylation and activation of p90(rsk)/MAPKAP kinase-1, *Curr Biol* (vol. 9), No. 5, pp.

- 281-4. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10074458
- Georges, R. N.; Mukhopadhyay, T.; Zhang, Y.; Yen, N. and Roth, J. A. (1993): Prevention of orthotopic human lung cancer growth by intratracheal instillation of a retroviral anti-sense K-ras construct, *Cancer Res* (vol. 53), No. 8, pp. 1743-6. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8467490
- Giancotti, V.; Pani, B.; D'Andrea, P.; Berlingieri, M. T.; Di Fiore, P. P.; Fusco, A.; Vecchio, G.; Philp, R.; Crane-Robinson, C.; Nicolas, R. H. and et al. (1987): Elevated levels of a specific class of nuclear phosphoproteins in cells transformed with v-ras and v-mos oncogenes and by cotransfection with c-myc and polyoma middle T genes, *EMBO J* (vol. 6), No. 7, pp. 1981-7. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2820715
- Gille, H.; Kortenjann, M.; Thomae, O.; Moomaw, C.; Slaughter, C.; Cobb, M. H. and Shaw, P. E. (1995): ERK phosphorylation potentiates Elk-1-mediated ternary complex formation and transactivation, *EMBO J* (vol. 14), No. 5, pp. 951-62. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7889942
- Gingras, A. C.; Raught, B. and Sonenberg, N. (1999): eIF4 initiation factors: effectors of mRNA recruitment to ribosomes and regulators of translation, *Annu Rev Biochem* (vol. 68), pp. 913-63. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10872469
- Giroux, S.; Tremblay, M.; Bernard, D.; Cardin-Girard, J. F.; Aubry, S.; Larouche, L.; Rousseau, S.; Huot, J.; Landry, J.; Jeannotte, L. and Charron, J. (1999): Embryonic death of Mek1-deficient mice reveals a role for this kinase in angiogenesis in the labyrinthine region of the placenta, *Curr Biol* (vol. 9), No. 7, pp. 369-72. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10209122
- Gonzalez, F. A.; Seth, A.; Raden, D. L.; Bowman, D. S.; Fay, F. S. and Davis, R. J. (1993): Serum-induced translocation of mitogen-activated protein kinase to the cell surface ruffling membrane and the nucleus, *J Cell Biol* (vol. 122), No. 5, pp. 1089-101. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8394846
- Gottlieb, T. M. and Oren, M. (1996): p53 in growth control and neoplasia, *Biochim Biophys Acta* (vol. 1287), No. 2-3, pp. 77-102. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8672531
- Grammer, T. C. and Blenis, J. (1997): Evidence for MEK-independent pathways regulating the prolonged activation of the ERK-MAP kinases, *Oncogene* (vol. 14), No. 14, pp. 1635-42. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9135064
- Griegel, S.; Traub, O.; Willecke, K. and Schafer, R. (1986): Suppression and re-expression

- of transformed phenotype in hybrids of HA-ras-1-transformed rat-1 cells and early-passage rat embryonic fibroblasts, *Int J Cancer* (vol. 38), No. 5, pp. 697-705. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3533793
- Groudine, M. and Weintraub, H. (1980): Activation of cellular genes by avian RNA tumor viruses, *Proc Natl Acad Sci U S A* (vol. 77), No. 9, pp. 5351-4. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=6254077
- Gu, Z.; Flemington, C.; Chittenden, T. and Zambetti, G. P. (2000): ei24, a p53 response gene involved in growth suppression and apoptosis, *Mol Cell Biol* (vol. 20), No. 1, pp. 233-41. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10594026
- Hagemann, C. and Rapp, U. R. (1999): Isotype-specific functions of Raf kinases, *Exp Cell Res* (vol. 253), No. 1, pp. 34-46. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10579909
- Hahn, W. C.; Counter, C. M.; Lundberg, A. S.; Beijersbergen, R. L.; Brooks, M. W. and Weinberg, R. A. (1999): Creation of human tumour cells with defined genetic elements, *Nature* (vol. 400), No. 6743, pp. 464-8. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10440377
- Hahn, W. C.; Dessain, S. K.; Brooks, M. W.; King, J. E.; Elenbaas, B.; Sabatini, D. M.; DeCaprio, J. A. and Weinberg, R. A. (2002): Enumeration of the simian virus 40 early region elements necessary for human cell transformation, *Mol Cell Biol* (vol. 22), No. 7, pp. 2111-23. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11884599
- Hahn, W. C. and Weinberg, R. A. (2002): Modelling the molecular circuitry of cancer, *Nat Rev Cancer* (vol. 2), No. 5, pp. 331-41. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12044009
- Hamad, N. M.; Elconin, J. H.; Karnoub, A. E.; Bai, W.; Rich, J. N.; Abraham, R. T.; Der, C. J. and Counter, C. M. (2002): Distinct requirements for Ras oncogenesis in human versus mouse cells, *Genes Dev* (vol. 16), No. 16, pp. 2045-57. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12183360
- Hanahan, D. and Weinberg, R. A. (2000): The hallmarks of cancer, *Cell* (vol. 100), No. 1, pp. 57-70. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10647931
- Haque, S. J. and Williams, B. R. (1998): Signal transduction in the interferon system, *Semin Oncol* (vol. 25), No. 1 Suppl 1, pp. 14-22. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9482536
- Hatano, N.; Mori, Y.; Oh-hora, M.; Kosugi, A.; Fujikawa, T.; Nakai, N.; Niwa, H.; Miyazaki, J.;

- Hamaoka, T. and Ogata, M. (2003): Essential role for ERK2 mitogen-activated protein kinase in placental development, *Genes Cells* (vol. 8), No. 11, pp. 847-56. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14622137
- Hayes, C. S.; DeFeo, K.; Lan, L.; Paul, B.; Sell, C. and Gilmour, S. K. (2006): Elevated levels of ornithine decarboxylase cooperate with Raf/ERK activation to convert normal keratinocytes into invasive malignant cells, *Oncogene* (vol. 25), No. 10, pp. 1543-53. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16278677
- Heinrich, J.; Bosse, M.; Eickhoff, H.; Nietfeld, W.; Reinhardt, R.; Lehrach, H. and Moelling, K. (2000): Induction of putative tumor-suppressing genes in Rat-1 fibroblasts by oncogenic Raf-1 as evidenced by robot-assisted complex hybridization, *J Mol Med* (vol. 78), No. 7, pp. 380-8. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11043381
- Hindley, A. and Kolch, W. (2002): Extracellular signal regulated kinase (ERK)/mitogen activated protein kinase (MAPK)-independent functions of Raf kinases, *J Cell Sci* (vol. 115), No. Pt 8, pp. 1575-81. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11950876
- Hingorani, S. R.; Jacobetz, M. A.; Robertson, G. P.; Herlyn, M. and Tuveson, D. A. (2003): Suppression of BRAF(V599E) in human melanoma abrogates transformation, *Cancer Res* (vol. 63), No. 17, pp. 5198-202. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14500344
- Holen, T.; Amarzguioui, M.; Wiiger, M. T.; Babaie, E. and Prydz, H. (2002): Positional effects of short interfering RNAs targeting the human coagulation trigger Tissue Factor, *Nucleic Acids Res* (vol. 30), No. 8, pp. 1757-66. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11937629
- Hsiao, K. M.; Chou, S. Y.; Shih, S. J. and Ferrell, J. E., Jr. (1994): Evidence that inactive p42 mitogen-activated protein kinase and inactive Rsk exist as a heterodimer in vivo, *Proc Natl Acad Sci U S A* (vol. 91), No. 12, pp. 5480-4. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8202512
- Hsieh, A. C.; Bo, R.; Manola, J.; Vazquez, F.; Bare, O.; Khvorova, A.; Scaringe, S. and Sellers, W. R. (2004): A library of siRNA duplexes targeting the phosphoinositide 3-kinase pathway: determinants of gene silencing for use in cell-based screens, *Nucleic Acids Res* (vol. 32), No. 3, pp. 893-901. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14769947
- Hunter, T. (1997): Oncoprotein networks, *Cell* (vol. 88), No. 3, pp. 333-46. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9039260
- Huot, T. J.; Rowe, J.; Harland, M.; Drayton, S.; Brookes, S.; Gooptu, C.; Purkis, P.; Fried,

- M.; Bataille, V.; Hara, E.; Newton-Bishop, J. and Peters, G. (2002): Biallelic mutations in p16(INK4a) confer resistance to Ras- and Ets-induced senescence in human diploid fibroblasts, *Mol Cell Biol* (vol. 22), No. 23, pp. 8135-43. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12417717
- Huser, M.; Luckett, J.; Chiloeches, A.; Mercer, K.; Iwobi, M.; Giblett, S.; Sun, X. M.; Brown, J.; Marais, R. and Pritchard, C. (2001): MEK kinase activity is not necessary for Raf-1 function, *EMBO J* (vol. 20), No. 8, pp. 1940-51. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11296227
- Hutvagner, G. and Zamore, P. D. (2002): RNAi: nature abhors a double-strand, *Curr Opin Genet Dev* (vol. 12), No. 2, pp. 225-32. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11893497
- Hyytiainen, M. and Keski-Oja, J. (2003): Latent TGF-beta binding protein LTBP-2 decreases fibroblast adhesion to fibronectin, *J Cell Biol* (vol. 163), No. 6, pp. 1363-74. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14691143
- Jackson, A. L.; Bartz, S. R.; Schelter, J.; Kobayashi, S. V.; Burchard, J.; Mao, M.; Li, B.; Cavet, G. and Linsley, P. S. (2003): Expression profiling reveals off-target gene regulation by RNAi, *Nat Biotechnol* (vol. 21), No. 6, pp. 635-7. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12754523
- Jaiswal, R. K.; Moodie, S. A.; Wolfman, A. and Landreth, G. E. (1994): The mitogen-activated protein kinase cascade is activated by B-Raf in response to nerve growth factor through interaction with p21ras, *Mol Cell Biol* (vol. 14), No. 10, pp. 6944-53. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7935411
- Janknecht, R.; Ernst, W. H.; Pingoud, V. and Nordheim, A. (1993): Activation of ternary complex factor Elk-1 by MAP kinases, *EMBO J* (vol. 12), No. 13, pp. 5097-104. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8262053
- Jeay, S.; Pianetti, S.; Kagan, H. M. and Sonenshein, G. E. (2003): Lysyl oxidase inhibits ras-mediated transformation by preventing activation of NF-kappa B, *Mol Cell Biol* (vol. 23), No. 7, pp. 2251-63. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12640111
- Jelinek, T.; Catling, A. D.; Reuter, C. W.; Moodie, S. A.; Wolfman, A. and Weber, M. J. (1994): RAS and RAF-1 form a signalling complex with MEK-1 but not MEK-2, *Mol Cell Biol* (vol. 14), No. 12, pp. 8212-8. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7969158
- Jin, Y.; Kim, H. P.; Ifedigbo, E.; Lau, L. F. and Choi, A. M. (2005): Cyr61 protects against hyperoxia-induced cell death via Akt pathway in pulmonary epithelial cells, *Am J Respir Cell Mol Biol* (vol. 33), No. 3, pp. 297-302. URL:

- http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15961723
- Jochum, W.; Passegue, E. and Wagner, E. F. (2001): AP-1 in mouse development and tumorigenesis, *Oncogene* (vol. 20), No. 19, pp. 2401-12. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11402336
- Jones, F. E.; Jerry, D. J.; Guarino, B. C.; Andrews, G. C. and Stern, D. F. (1996): Heregulin induces in vivo proliferation and differentiation of mammary epithelium into secretory lobuloalveoli, *Cell Growth Differ* (vol. 7), No. 8, pp. 1031-8. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8853899
- Joyce, D.; Albanese, C.; Steer, J.; Fu, M.; Bouzahzah, B. and Pestell, R. G. (2001): NF-kappaB and cell-cycle regulation: the cyclin connection, *Cytokine Growth Factor Rev* (vol. 12), No. 1, pp. 73-90. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11312120
- Kaiser, A. D. and Hogness, D. S. (1960): The transformation of *Escherichia coli* with deoxyribonucleic acid isolated from bacteriophage lambda-dg, *J Mol Biol* (vol. 2), pp. 392-415. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=13750787
- Kamakura, S.; Moriguchi, T. and Nishida, E. (1999): Activation of the protein kinase ERK5/BMK1 by receptor tyrosine kinases. Identification and characterization of a signaling pathway to the nucleus, *J Biol Chem* (vol. 274), No. 37, pp. 26563-71. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10473620
- Kampfer, S.; Windegger, M.; Hochholdinger, F.; Schwaiger, W.; Pestell, R. G.; Baier, G.; Grunicke, H. H. and Uberall, F. (2001): Protein kinase C isoforms involved in the transcriptional activation of cyclin D1 by transforming Ha-Ras, *J Biol Chem* (vol. 276), No. 46, pp. 42834-42. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11551901
- Karlsson, C.; Afrakhte, M.; Westermarck, B. and Paulsson, Y. (1999): Elevated level of gas3 gene expression is correlated with G0 growth arrest in human fibroblasts, *Cell Biol Int* (vol. 23), No. 5, pp. 351-8. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10579901
- Kennerdell, J. R. and Carthew, R. W. (1998): Use of dsRNA-mediated genetic interference to demonstrate that frizzled and frizzled 2 act in the wingless pathway, *Cell* (vol. 95), No. 7, pp. 1017-26. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9875855
- Kessler, R.; Zacharova-Albinger, A.; Laursen, N. B.; Kalousek, M. and Klemenz, R. (1999): Attenuated expression of the serum responsive T1 gene in ras transformed fibroblasts due to the inhibition of c-fos gene activity, *Oncogene* (vol. 18), No. 9, pp. 1733-44. URL:

- http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10208434
- Khokhlatchev, A.; Xu, S.; English, J.; Wu, P.; Schaefer, E. and Cobb, M. H. (1997): Reconstitution of mitogen-activated protein kinase phosphorylation cascades in bacteria. Efficient synthesis of active protein kinases, *J Biol Chem* (vol. 272), No. 17, pp. 11057-62. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9110999
- Khosravi-Far, R.; White, M. A.; Westwick, J. K.; Soltski, P. A.; Chrzanowska-Wodnicka, M.; Van Aelst, L.; Wigler, M. H. and Der, C. J. (1996): Oncogenic Ras activation of Raf/mitogen-activated protein kinase-independent pathways is sufficient to cause tumorigenic transformation, *Mol Cell Biol* (vol. 16), No. 7, pp. 3923-33. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8668210
- Kim, J. S.; Lee, C.; Foxworth, A. and Waldman, T. (2004): B-Raf is dispensable for K-Ras-mediated oncogenesis in human cancer cells, *Cancer Res* (vol. 64), No. 6, pp. 1932-7. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15026326
- Ko, L. J. and Prives, C. (1996): p53: puzzle and paradigm, *Genes Dev* (vol. 10), No. 9, pp. 1054-72. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8654922
- Kogerman, P.; Sy, M. S. and Culp, L. A. (1996): CD44 protein levels and its biological activity are regulated in Balb/c 3T3 fibroblasts by serum factors and by transformation with the ras but not with the sis oncogene, *J Cell Physiol* (vol. 169), No. 2, pp. 341-9. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8908201
- Kohl, N. E.; Wilson, F. R.; Mosser, S. D.; Giuliani, E.; deSolms, S. J.; Conner, M. W.; Anthony, N. J.; Holtz, W. J.; Gomez, R. P.; Lee, T. J. and et al. (1994): Protein farnesyl-transferase inhibitors block the growth of ras-dependent tumors in nude mice, *Proc Natl Acad Sci U S A* (vol. 91), No. 19, pp. 9141-5. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8090782
- Kolch, W. (2000): Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions, *Biochem J* (vol. 351 Pt 2), pp. 289-305. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11023813
- Kolch, W. (2001): To be or not to be: a question of B-Raf?, *Trends Neurosci* (vol. 24), No. 9, pp. 498-500. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11506871
- Kolch, W. (2005): Coordinating ERK/MAPK signalling through scaffolds and inhibitors, *Nat Rev Mol Cell Biol* (vol. 6), No. 11, pp. 827-37. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16100000

- tion&list_uids=16227978
- Kolfschoten, I. G.; van Leeuwen, B.; Berns, K.; Mullenders, J.; Beijersbergen, R. L.; Bernards, R.; Voorhoeve, P. M. and Agami, R. (2005): A genetic screen identifies PITX1 as a suppressor of RAS activity and tumorigenicity, *Cell* (vol. 121), No. 6, pp. 849-58. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15960973
- Kumar, R.; Conklin, D. S. and Mittal, V. (2003): High-throughput selection of effective RNAi probes for gene silencing, *Genome Res* (vol. 13), No. 10, pp. 2333-40. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14525931
- Kuno, K.; Bannai, K.; Hakozaki, M.; Matsushima, K. and Hirose, K. (2004): The carboxyl-terminal half region of ADAMTS-1 suppresses both tumorigenicity and experimental tumor metastatic potential, *Biochem Biophys Res Commun* (vol. 319), No. 4, pp. 1327-33. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15194513
- Kyriakis, J. M.; App, H.; Zhang, X. F.; Banerjee, P.; Brautigan, D. L.; Rapp, U. R. and Avruch, J. (1992): Raf-1 activates MAP kinase-kinase, *Nature* (vol. 358), No. 6385, pp. 417-21. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1322500
- Lallemant, D.; Spyrou, G.; Yaniv, M. and Pfarr, C. M. (1997): Variations in Jun and Fos protein expression and AP-1 activity in cycling, resting and stimulated fibroblasts, *Oncogene* (vol. 14), No. 7, pp. 819-30. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9047389
- Lee, Y. S.; Nakahara, K.; Pham, J. W.; Kim, K.; He, Z.; Sontheimer, E. J. and Carthew, R. W. (2004): Distinct roles for Drosophila Dicer-1 and Dicer-2 in the siRNA/miRNA silencing pathways, *Cell* (vol. 117), No. 1, pp. 69-81. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15066283
- Lehar, S. M.; Nacht, M.; Jacks, T.; Vater, C. A.; Chittenden, T. and Guild, B. C. (1996): Identification and cloning of EI24, a gene induced by p53 in etoposide-treated cells, *Oncogene* (vol. 12), No. 6, pp. 1181-7. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8649819
- Lenormand, P.; Sardet, C.; Pages, G.; L'Allemain, G.; Brunet, A. and Pouyssegur, J. (1993): Growth factors induce nuclear translocation of MAP kinases (p42mapk and p44mapk) but not of their activator MAP kinase kinase (p45mapkk) in fibroblasts, *J Cell Biol* (vol. 122), No. 5, pp. 1079-88. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8394845
- Levine, A. J. (1993): 11th Ernst Klenk Lecture. The p53 tumor suppressor gene and product, *Biol Chem Hoppe Seyler* (vol. 374), No. 4, pp. 227-35. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8394845

- tion&list_uids=8329141
- Li, W.; Melnick, M. and Perrimon, N. (1998): Dual function of Ras in Raf activation, *Development* (vol. 125), No. 24, pp. 4999-5008. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9811584
- Li, W.; Nugent, M. A.; Zhao, Y.; Chau, A. N.; Li, S. J.; Chou, I. N.; Liu, G. and Kagan, H. M. (2003): Lysyl oxidase oxidizes basic fibroblast growth factor and inactivates its mitogenic potential, *J Cell Biochem* (vol. 88), No. 1, pp. 152-64. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12461785
- Li, Y. J.; Song, R.; Korkola, J. E.; Archer, M. C. and Ben-David, Y. (2003): Cyclin D1 is necessary but not sufficient for anchorage-independent growth of rat mammary tumor cells and is associated with resistance of the Copenhagen rat to mammary carcinogenesis, *Oncogene* (vol. 22), No. 22, pp. 3452-62. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12776197
- Liang, P.; Averboukh, L.; Zhu, W. and Pardee, A. B. (1994): Ras activation of genes: Mob-1 as a model, *Proc Natl Acad Sci U S A* (vol. 91), No. 26, pp. 12515-9. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7809069
- Lin, L. L.; Wartmann, M.; Lin, A. Y.; Knopf, J. L.; Seth, A. and Davis, R. J. (1993): cPLA2 is phosphorylated and activated by MAP kinase, *Cell* (vol. 72), No. 2, pp. 269-78. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8381049
- Liu, J. J.; Chao, J. R.; Jiang, M. C.; Ng, S. Y.; Yen, J. J. and Yang-Yen, H. F. (1995): Ras transformation results in an elevated level of cyclin D1 and acceleration of G1 progression in NIH 3T3 cells, *Mol Cell Biol* (vol. 15), No. 7, pp. 3654-63. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7791772
- Liu, Q.; Rand, T. A.; Kalidas, S.; Du, F.; Kim, H. E.; Smith, D. P. and Wang, X. (2003): R2D2, a bridge between the initiation and effector steps of the Drosophila RNAi pathway, *Science* (vol. 301), No. 5641, pp. 1921-5. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14512631
- Liu, X.; Yan, S.; Zhou, T.; Terada, Y. and Erikson, R. L. (2004): The MAP kinase pathway is required for entry into mitosis and cell survival, *Oncogene* (vol. 23), No. 3, pp. 763-76. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14737111
- Lowy, D. R. and Willumsen, B. M. (1993): Function and regulation of ras, *Annu Rev Biochem* (vol. 62), pp. 851-91. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8352603
- Luo, Z.; Tzivion, G.; Belshaw, P. J.; Vavvas, D.; Marshall, M. and Avruch, J. (1996): Oligomerization activates c-Raf-1 through a Ras-dependent mechanism, *Nature* (vol. 383), No. 6596, pp. 181-5. URL:

- http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8774885
- Macaluso, M.; Russo, G.; Cinti, C.; Bazan, V.; Gebbia, N. and Russo, A. (2002): Ras family genes: an interesting link between cell cycle and cancer, *J Cell Physiol* (vol. 192), No. 2, pp. 125-30. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12115718
- Macdonald, S. G.; Crews, C. M.; Wu, L.; Driller, J.; Clark, R.; Erikson, R. L. and McCormick, F. (1993): Reconstitution of the Raf-1-MEK-ERK signal transduction pathway in vitro, *Mol Cell Biol* (vol. 13), No. 11, pp. 6615-20. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8413257
- Maeda, T.; Alexander, C. M. and Friedl, A. (2004): Induction of syndecan-1 expression in stromal fibroblasts promotes proliferation of human breast cancer cells, *Cancer Res* (vol. 64), No. 2, pp. 612-21. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14744776
- Malumbres, M. and Pellicer, A. (1998): RAS pathways to cell cycle control and cell transformation, *Front Biosci* (vol. 3), pp. d887-912. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9696882
- Marais, R.; Light, Y.; Paterson, H. F. and Marshall, C. J. (1995): Ras recruits Raf-1 to the plasma membrane for activation by tyrosine phosphorylation, *EMBO J* (vol. 14), No. 13, pp. 3136-45. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7542586
- Marais, R.; Light, Y.; Paterson, H. F.; Mason, C. S. and Marshall, C. J. (1997): Differential regulation of Raf-1, A-Raf, and B-Raf by oncogenic ras and tyrosine kinases, *J Biol Chem* (vol. 272), No. 7, pp. 4378-83. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9020159
- Marais, R. and Marshall, C. J. (1996): Control of the ERK MAP kinase cascade by Ras and Raf, *Cancer Surv* (vol. 27), pp. 101-25. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8909797
- Marshall, C. (1999): How do small GTPase signal transduction pathways regulate cell cycle entry?, *Curr Opin Cell Biol* (vol. 11), No. 6, pp. 732-6. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10600705
- Marshall, C. J. (1995): Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation, *Cell* (vol. 80), No. 2, pp. 179-85. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7834738
- Marshall, C. J. (1996): Cell signalling. Raf gets it together, *Nature* (vol. 383), No. 6596, pp. 127-8. URL:

- http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8774875
- Marte, B. M.; Jeschke, M.; Graus-Porta, D.; Taverna, D.; Hofer, P.; Groner, B.; Yarden, Y. and Hynes, N. E. (1995): Neu differentiation factor/heregulin modulates growth and differentiation of HC11 mammary epithelial cells, *Mol Endocrinol* (vol. 9), No. 1, pp. 14-23. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7760847
- Martinez, J.; Patkaniowska, A.; Urlaub, H.; Luhrmann, R. and Tuschl, T. (2002): Single-stranded antisense siRNAs guide target RNA cleavage in RNAi, *Cell* (vol. 110), No. 5, pp. 563-74. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12230974
- Martinez, J. and Tuschl, T. (2004): RISC is a 5' phosphomonoester-producing RNA endonuclease, *Genes Dev* (vol. 18), No. 9, pp. 975-80. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15105377
- Mason, C. S.; Springer, C. J.; Cooper, R. G.; Superti-Furga, G.; Marshall, C. J. and Marais, R. (1999): Serine and tyrosine phosphorylations cooperate in Raf-1, but not B-Raf activation, *EMBO J* (vol. 18), No. 8, pp. 2137-48. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10205168
- Massa, A.; Barbieri, F.; Aiello, C.; Iuliano, R.; Arena, S.; Pattarozzi, A.; Corsaro, A.; Villa, V.; Fusco, A.; Zona, G.; Spaziante, R.; Schettini, G. and Florio, T. (2004): The phosphotyrosine phosphatase eta mediates somatostatin inhibition of glioma proliferation via the dephosphorylation of ERK1/2, *Ann N Y Acad Sci* (vol. 1030), pp. 264-74. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15659806
- Mazure, N. M.; Chen, E. Y.; Yeh, P.; Laderoute, K. R. and Giaccia, A. J. (1996): Oncogenic transformation and hypoxia synergistically act to modulate vascular endothelial growth factor expression, *Cancer Res* (vol. 56), No. 15, pp. 3436-40. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8758908
- McNulty, S. E.; Tohidian, N. B. and Meyskens, F. L., Jr. (2001): RelA, p50 and inhibitor of kappa B alpha are elevated in human metastatic melanoma cells and respond aberrantly to ultraviolet light B, *Pigment Cell Res* (vol. 14), No. 6, pp. 456-65. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11775058
- Mercer, K.; Chiloeches, A.; Huser, M.; Kiernan, M.; Marais, R. and Pritchard, C. (2002): ERK signalling and oncogene transformation are not impaired in cells lacking A-Raf, *Oncogene* (vol. 21), No. 3, pp. 347-55. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11821947
- Mikula, M.; Schreiber, M.; Husak, Z.; Kuceroval, L.; Ruth, J.; Wieser, R.; Zatloukal, K.; Beug, H.; Wagner, E. F. and Baccarini, M. (2001): Embryonic lethality and fetal liver apoptosis in mice lacking the c-raf-1 gene, *EMBO J* (vol. 20), No. 8, pp. 1952-62. URL:

- http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11296228
- Misquitta, L. and Paterson, B. M. (1999): Targeted disruption of gene function in *Drosophila* by RNA interference (RNA-i): a role for nautilus in embryonic somatic muscle formation, *Proc Natl Acad Sci U S A* (vol. 96), No. 4, pp. 1451-6. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9990044
- Moodie, S. A.; Willumsen, B. M.; Weber, M. J. and Wolfman, A. (1993): Complexes of Ras.GTP with Raf-1 and mitogen-activated protein kinase kinase, *Science* (vol. 260), No. 5114, pp. 1658-61. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8503013
- Morrison, D. K.; Heidecker, G.; Rapp, U. R. and Copeland, T. D. (1993): Identification of the major phosphorylation sites of the Raf-1 kinase, *J Biol Chem* (vol. 268), No. 23, pp. 17309-16. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8349614
- Mousses, S.; Caplen, N. J.; Cornelison, R.; Weaver, D.; Basik, M.; Hautaniemi, S.; Elkah-loun, A. G.; Lotufo, R. A.; Choudary, A.; Dougherty, E. R.; Suh, E. and Kallioniemi, O. (2003): RNAi microarray analysis in cultured mammalian cells, *Genome Res* (vol. 13), No. 10, pp. 2341-7. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14525932
- Mukhopadhyay, T.; Tainsky, M.; Cavender, A. C. and Roth, J. A. (1991): Specific inhibition of K-ras expression and tumorigenicity of lung cancer cells by antisense RNA, *Cancer Res* (vol. 51), No. 6, pp. 1744-8. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1998965
- Mulcahy, L. S.; Smith, M. R. and Stacey, D. W. (1985): Requirement for ras proto-oncogene function during serum-stimulated growth of NIH 3T3 cells, *Nature* (vol. 313), No. 5999, pp. 241-3. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3918269
- Napoli, C.; Lemieux, C. and Jorgensen, R. (1990): Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into *Petunia* Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans, *Plant Cell* (vol. 2), No. 4, pp. 279-289. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12354959
- Nemoto, T.; Hori, H.; Yoshimoto, M.; Seyama, Y. and Kubota, S. (2002): Overexpression of ornithine decarboxylase enhances endothelial proliferation by suppressing endostatin expression, *Blood* (vol. 99), No. 4, pp. 1478-81. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11830503
- Ngo, H.; Tschudi, C.; Gull, K. and Ullu, E. (1998): Double-stranded RNA induces mRNA degradation in *Trypanosoma brucei*, *Proc Natl Acad Sci U S A* (vol. 95), No. 25, pp. 14687-92. URL:

- http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9843950
- Nishiu, M.; Yanagawa, R.; Nakatsuka, S.; Yao, M.; Tsunoda, T.; Nakamura, Y. and Aozasa, K. (2002): Microarray analysis of gene-expression profiles in diffuse large B-cell lymphoma: identification of genes related to disease progression, *Jpn J Cancer Res* (vol. 93), No. 8, pp. 894-901. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12716467
- Nobes, C. D. and Hall, A. (1995): Rho, rac and cdc42 GTPases: regulators of actin structures, cell adhesion and motility, *Biochem Soc Trans* (vol. 23), No. 3, pp. 456-9. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8566347
- Novarino, G.; Fabrizi, C.; Tonini, R.; Denti, M. A.; Malchiodi-Albedi, F.; Lauro, G. M.; Sacchetti, B.; Paradisi, S.; Ferroni, A.; Curmi, P. M.; Breit, S. N. and Mazzanti, M. (2004): Involvement of the intracellular ion channel CLIC1 in microglia-mediated beta-amyloid-induced neurotoxicity, *J Neurosci* (vol. 24), No. 23, pp. 5322-30. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15190104
- Nowell, P. C. (1976): The clonal evolution of tumor cell populations, *Science* (vol. 194), No. 4260, pp. 23-8. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=959840
- Nykanen, A.; Haley, B. and Zamore, P. D. (2001): ATP requirements and small interfering RNA structure in the RNA interference pathway, *Cell* (vol. 107), No. 3, pp. 309-21. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11701122
- Ogiso, Y.; Sakai, N.; Watari, H.; Yokoyama, T. and Kuzumaki, N. (1994): Suppression of various human tumor cell lines by a dominant negative H-ras mutant, *Gene Ther* (vol. 1), No. 6, pp. 403-7. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7584106
- Pages, G.; Guerin, S.; Grall, D.; Bonino, F.; Smith, A.; Anjuere, F.; Auberger, P. and Pouyssegur, J. (1999): Defective thymocyte maturation in p44 MAP kinase (Erk 1) knockout mice, *Science* (vol. 286), No. 5443, pp. 1374-7. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10558995
- Palamakumbura, A. H.; Jeay, S.; Guo, Y.; Pischon, N.; Sommer, P.; Sonenshein, G. E. and Trackman, P. C. (2004): The propeptide domain of lysyl oxidase induces phenotypic reversion of ras-transformed cells, *J Biol Chem* (vol. 279), No. 39, pp. 40593-600. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15277520
- Pancoska, P.; Moravek, Z. and Moll, U. M. (2004): Efficient RNA interference depends on global context of the target sequence: quantitative analysis of silencing efficiency using Eulerian graph representation of siRNA, *Nucleic Acids Res* (vol. 32), No. 4, pp.

- 1469-79. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14993466
- Papin, C.; Denouel, A.; Calothy, G. and Eychene, A. (1996): Identification of signalling proteins interacting with B-Raf in the yeast two-hybrid system, *Oncogene* (vol. 12), No. 10, pp. 2213-21. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8668348
- Papin, C.; Denouel-Galy, A.; Laugier, D.; Calothy, G. and Eychene, A. (1998): Modulation of kinase activity and oncogenic properties by alternative splicing reveals a novel regulatory mechanism for B-Raf, *J Biol Chem* (vol. 273), No. 38, pp. 24939-47. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9733801
- Parada, L. F.; Tabin, C. J.; Shih, C. and Weinberg, R. A. (1982): Human EJ bladder carcinoma oncogene is homologue of Harvey sarcoma virus ras gene, *Nature* (vol. 297), No. 5866, pp. 474-8. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=6283357
- Parfett, C. L. (1992): Induction of proliferin gene expression by diverse chemical agents that promote morphological transformation in C3H/10T1/2 cultures, *Cancer Lett* (vol. 64), No. 1, pp. 1-9. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1596871
- Passegue, E. and Wagner, E. F. (2000): JunB suppresses cell proliferation by transcriptional activation of p16(INK4a) expression, *EMBO J* (vol. 19), No. 12, pp. 2969-79. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10856241
- Patturajan, M.; Nomoto, S.; Sommer, M.; Fomenkov, A.; Hibi, K.; Zangen, R.; Poliak, N.; Califano, J.; Trink, B.; Ratovitski, E. and Sidransky, D. (2002): DeltaNp63 induces beta-catenin nuclear accumulation and signaling, *Cancer Cell* (vol. 1), No. 4, pp. 369-79. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12086851
- Payne, D. M.; Rossomando, A. J.; Martino, P.; Erickson, A. K.; Her, J. H.; Shabanowitz, J.; Hunt, D. F.; Weber, M. J. and Sturgill, T. W. (1991): Identification of the regulatory phosphorylation sites in pp42/mitogen-activated protein kinase (MAP kinase), *EMBO J* (vol. 10), No. 4, pp. 885-92. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1849075
- Peles, E.; Bacus, S. S.; Koski, R. A.; Lu, H. S.; Wen, D.; Ogden, S. G.; Levy, R. B. and Yarden, Y. (1992): Isolation of the neu/HER-2 stimulatory ligand: a 44 kd glycoprotein that induces differentiation of mammary tumor cells, *Cell* (vol. 69), No. 1, pp. 205-16. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1348215

- Pham, J. W.; Pellino, J. L.; Lee, Y. S.; Carthew, R. W. and Sontheimer, E. J. (2004): A Dicer-2-dependent 80s complex cleaves targeted mRNAs during RNAi in *Drosophila*, *Cell* (vol. 117), No. 1, pp. 83-94. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15066284
- Polunovsky, V. A.; Gingras, A. C.; Sonenberg, N.; Peterson, M.; Tan, A.; Rubins, J. B.; Manivel, J. C. and Bitterman, P. B. (2000): Translational control of the antiapoptotic function of Ras, *J Biol Chem* (vol. 275), No. 32, pp. 24776-80. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10811643
- Pritchard, C. A.; Bolin, L.; Slattey, R.; Murray, R. and McMahon, M. (1996): Post-natal lethality and neurological and gastrointestinal defects in mice with targeted disruption of the A-Raf protein kinase gene, *Curr Biol* (vol. 6), No. 5, pp. 614-7. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8805280
- Pritchard, C. A.; Samuels, M. L.; Bosch, E. and McMahon, M. (1995): Conditionally oncogenic forms of the A-Raf and B-Raf protein kinases display different biological and biochemical properties in NIH 3T3 cells, *Mol Cell Biol* (vol. 15), No. 11, pp. 6430-42. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7565795
- Provost, P.; Dishart, D.; Doucet, J.; Frendewey, D.; Samuelsson, B. and Radmark, O. (2002): Ribonuclease activity and RNA binding of recombinant human Dicer, *EMBO J* (vol. 21), No. 21, pp. 5864-74. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12411504
- Rajagopalan, H.; Bardelli, A.; Lengauer, C.; Kinzler, K. W.; Vogelstein, B. and Velculescu, V. E. (2002): Tumorigenesis: RAF/RAS oncogenes and mismatch-repair status, *Nature* (vol. 418), No. 6901, p. 934. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12198537
- Reinheckel, T.; Hagemann, S.; Dollwet-Mack, S.; Martinez, E.; Lohmuller, T.; Zlatkovic, G.; Tobin, D. J.; Maas-Szabowski, N. and Peters, C. (2005): The lysosomal cysteine protease cathepsin L regulates keratinocyte proliferation by control of growth factor recycling, *J Cell Sci* (vol. 118), No. Pt 15, pp. 3387-95. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16079282
- Repasky, G. A.; Chenette, E. J. and Der, C. J. (2004): Renewing the conspiracy theory debate: does Raf function alone to mediate Ras oncogenesis?, *Trends Cell Biol* (vol. 14), No. 11, pp. 639-47. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15519853
- Reuter, C. W.; Catling, A. D.; Jelinek, T. and Weber, M. J. (1995): Biochemical analysis of MEK activation in NIH3T3 fibroblasts. Identification of B-Raf and other activators, *J Biol Chem* (vol. 270), No. 13, pp. 7644-55. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7565795

- tion&list_uids=7706312
- Reuther, G. W. and Der, C. J. (2000): The Ras branch of small GTPases: Ras family members don't fall far from the tree, *Curr Opin Cell Biol* (vol. 12), No. 2, pp. 157-65. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10712923
- Reynolds, A.; Leake, D.; Boese, Q.; Scaringe, S.; Marshall, W. S. and Khvorova, A. (2004): Rational siRNA design for RNA interference, *Nat Biotechnol* (vol. 22), No. 3, pp. 326-30. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14758366
- Risse-Hackl, G.; Adamkiewicz, J.; Wimmel, A. and Schuermann, M. (1998): Transition from SCLC to NSCLC phenotype is accompanied by an increased TRE-binding activity and recruitment of specific AP-1 proteins, *Oncogene* (vol. 16), No. 23, pp. 3057-68. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9662339
- Robinson, M. J.; Cheng, M.; Khokhlatchev, A.; Ebert, D.; Ahn, N.; Guan, K. L.; Stein, B.; Goldsmith, E. and Cobb, M. H. (1996): Contributions of the mitogen-activated protein (MAP) kinase backbone and phosphorylation loop to MEK specificity, *J Biol Chem* (vol. 271), No. 47, pp. 29734-9. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8939908
- Roovers, K. and Assoian, R. K. (2000): Integrating the MAP kinase signal into the G1 phase cell cycle machinery, *Bioessays* (vol. 22), No. 9, pp. 818-26. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10944584
- Rusnati, M.; Camozzi, M.; Moroni, E.; Bottazzi, B.; Peri, G.; Indraccolo, S.; Amadori, A.; Mantovani, A. and Presta, M. (2004): Selective recognition of fibroblast growth factor-2 by the long pentraxin PTX3 inhibits angiogenesis, *Blood* (vol. 104), No. 1, pp. 92-9. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15031207
- Saba-El-Leil, M. K.; Vella, F. D.; Vernay, B.; Voisin, L.; Chen, L.; Labrecque, N.; Ang, S. L. and Meloche, S. (2003): An essential function of the mitogen-activated protein kinase Erk2 in mouse trophoblast development, *EMBO Rep* (vol. 4), No. 10, pp. 964-8. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14502223
- Sager, R.; Sheng, S.; Pemberton, P. and Hendrix, M. J. (1997): Maspin. A tumor suppressing serpin, *Adv Exp Med Biol* (vol. 425), pp. 77-88. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9433491
- Sakamoto, S.; Yokoyama, M.; Aoki, M.; Suzuki, K.; Kakehi, Y. and Saito, Y. (2004): Induction and function of CYR61 (CCN1) in prostatic stromal and epithelial cells: CYR61 is required for prostatic cell proliferation, *Prostate* (vol. 61), No. 4, pp. 305-17. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15389821

- Sanchez Alvarado, A. and Newmark, P. A. (1999): Double-stranded RNA specifically disrupts gene expression during planarian regeneration, *Proc Natl Acad Sci U S A* (vol. 96), No. 9, pp. 5049-54. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10220416
- Schaffner, W. and Weissmann, C. (1973): A rapid, sensitive, and specific method for the determination of protein in dilute solution, *Anal Biochem* (vol. 56), No. 2, pp. 502-14. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=4128882
- Schroder, K.; Hertzog, P. J.; Ravasi, T. and Hume, D. A. (2004): Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions, *J Leukoc Biol* (vol. 75), No. 2, pp. 163-89. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14525967
- Schulze, A.; Lehmann, K.; Jefferies, H. B.; McMahon, M. and Downward, J. (2001): Analysis of the transcriptional program induced by Raf in epithelial cells, *Genes Dev* (vol. 15), No. 8, pp. 981-94. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11316792
- Schuringa, J. J.; Jonk, L. J.; Dokter, W. H.; Vellenga, E. and Kruijer, W. (2000): Interleukin-6-induced STAT3 transactivation and Ser727 phosphorylation involves Vav, Rac-1 and the kinase SEK-1/MKK-4 as signal transduction components, *Biochem J* (vol. 347 Pt 1), pp. 89-96. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10727406
- Schwarz, D. S.; Hutvagner, G.; Haley, B. and Zamore, P. D. (2002): Evidence that siRNAs function as guides, not primers, in the *Drosophila* and human RNAi pathways, *Mol Cell* (vol. 10), No. 3, pp. 537-48. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12408822
- Seeger, Y. R.; Garcia-Cao, M.; Piccinin, S.; Cunsolo, C. L.; Doglioni, C.; Blasco, M. A.; Hannon, G. J. and Maestro, R. (2002): Transformation of normal human cells in the absence of telomerase activation, *Cancer Cell* (vol. 2), No. 5, pp. 401-13. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12450795
- Seidel, J. J. and Graves, B. J. (2002): An ERK2 docking site in the Pointed domain distinguishes a subset of ETS transcription factors, *Genes Dev* (vol. 16), No. 1, pp. 127-37. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11782450
- Seliger, B.; Pfizenmaier, K. and Schafer, R. (1991): Short-term treatment with gamma interferon induces stable reversion of ras-transformed mouse fibroblasts, *J Virol* (vol. 65), No. 11, pp. 6307-11. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1717721

- Sengupta, K.; Banerjee, S.; Saxena, N. K. and Banerjee, S. K. (2004): Thombospondin-1 disrupts estrogen-induced endothelial cell proliferation and migration and its expression is suppressed by estradiol, *Mol Cancer Res* (vol. 2), No. 3, pp. 150-8. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15037654
- Senmaru, N.; Shichinohe, T.; Takeuchi, M.; Miyamoto, M.; Sazawa, A.; Ogiso, Y.; Takahashi, T.; Okushiba, S.; Takimoto, M.; Kato, H. and Kuzumaki, N. (1998): Suppression of Erk activation and in vivo growth in esophageal cancer cells by the dominant negative Ras mutant, N116Y, *Int J Cancer* (vol. 78), No. 3, pp. 366-71. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9766573
- Serrano, M.; Lin, A. W.; McCurrach, M. E.; Beach, D. and Lowe, S. W. (1997): Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a, *Cell* (vol. 88), No. 5, pp. 593-602. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9054499
- Sers, C.; Emmenegger, U.; Husmann, K.; Bucher, K.; Andres, A. C. and Schafer, R. (1997): Growth-inhibitory activity and downregulation of the class II tumor-suppressor gene H-rev107 in tumor cell lines and experimental tumors, *J Cell Biol* (vol. 136), No. 4, pp. 935-44. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9049257
- Shantz, L. M. and Pegg, A. E. (1994): Overproduction of ornithine decarboxylase caused by relief of translational repression is associated with neoplastic transformation, *Cancer Res* (vol. 54), No. 9, pp. 2313-6. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8162572
- Shao, J.; Evers, B. M. and Sheng, H. (2004): Roles of phosphatidylinositol 3'-kinase and mammalian target of rapamycin/p70 ribosomal protein S6 kinase in K-Ras-mediated transformation of intestinal epithelial cells, *Cancer Res* (vol. 64), No. 1, pp. 229-35. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14729629
- Shapiro, P. S.; Whalen, A. M.; Tolwinski, N. S.; Wilsbacher, J.; Froelich-Ammon, S. J.; Garcia, M.; Osheroff, N. and Ahn, N. G. (1999): Extracellular signal-regulated kinase activates topoisomerase IIalpha through a mechanism independent of phosphorylation, *Mol Cell Biol* (vol. 19), No. 5, pp. 3551-60. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10207078
- Sharrocks, A. D.; Yang, S. H. and Galanis, A. (2000): Docking domains and substrate-specificity determination for MAP kinases, *Trends Biochem Sci* (vol. 25), No. 9, pp. 448-53. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10973059
- Shaulian, E. and Karin, M. (2001): AP-1 in cell proliferation and survival, *Oncogene* (vol. 20), No. 19, pp. 2390-400. URL:

- http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11402335
- Sheng, H.; Williams, C. S.; Shao, J.; Liang, P.; DuBois, R. N. and Beauchamp, R. D. (1998): Induction of cyclooxygenase-2 by activated Ha-ras oncogene in Rat-1 fibroblasts and the role of mitogen-activated protein kinase pathway, *J Biol Chem* (vol. 273), No. 34, pp. 22120-7. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9705357
- Shichinohe, T.; Senmaru, N.; Furuuchi, K.; Ogiso, Y.; Ishikura, H.; Yoshiki, T.; Takahashi, T.; Kato, H. and Kuzumaki, N. (1996): Suppression of pancreatic cancer by the dominant negative ras mutant, N116Y, *J Surg Res* (vol. 66), No. 2, pp. 125-30. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9024823
- Shields, J. M.; Pruitt, K.; McFall, A.; Shaub, A. and Der, C. J. (2000): Understanding Ras: 'it ain't over 'til it's over', *Trends Cell Biol* (vol. 10), No. 4, pp. 147-54. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10740269
- Shirasawa, S.; Furuse, M.; Yokoyama, N. and Sasazuki, T. (1993): Altered growth of human colon cancer cell lines disrupted at activated Ki-ras, *Science* (vol. 260), No. 5104, pp. 85-8. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8465203
- Silva, J.; Chang, K.; Hannon, G. J. and Rivas, F. V. (2004): RNA-interference-based functional genomics in mammalian cells: reverse genetics coming of age, *Oncogene* (vol. 23), No. 51, pp. 8401-9. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15517022
- Simpson, L. and Parsons, R. (2001): PTEN: life as a tumor suppressor, *Exp Cell Res* (vol. 264), No. 1, pp. 29-41. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11237521
- Sistonen, L.; Sarge, K. D.; Phillips, B.; Abravaya, K. and Morimoto, R. I. (1992): Activation of heat shock factor 2 during hemin-induced differentiation of human erythroleukemia cells, *Mol Cell Biol* (vol. 12), No. 9, pp. 4104-11. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1508207
- Slack, J. L.; Parker, M. I.; Robinson, V. R. and Bornstein, P. (1992): Regulation of collagen I gene expression by ras, *Mol Cell Biol* (vol. 12), No. 10, pp. 4714-23. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1406656
- Sledz, C. A.; Holko, M.; de Veer, M. J.; Silverman, R. H. and Williams, B. R. (2003): Activation of the interferon system by short-interfering RNAs, *Nat Cell Biol* (vol. 5), No. 9, pp. 834-9. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12942087
- Smith-Mungo, L. and Kagan, H. M. (2002): PKC-MEK-MAPK-dependent signal transduction

- pathway mediates the stimulation of lysyl oxidase expression by serum and PDGF in rat aortic smooth muscle cells, *J Cell Biochem* (vol. 85), No. 4, pp. 775-84. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11968017
- Song, J.; Takeda, M. and Morimoto, R. I. (2001): Bag1-Hsp70 mediates a physiological stress signalling pathway that regulates Raf-1/ERK and cell growth, *Nat Cell Biol* (vol. 3), No. 3, pp. 276-82. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11231577
- Song, J. H.; Wang, C. X.; Song, D. K.; Wang, P.; Shuaib, A. and Hao, C. (2005): Interferon gamma induces neurite outgrowth by up-regulation of p35 neuron-specific cyclin-dependent kinase 5 activator via activation of ERK1/2 pathway, *J Biol Chem* (vol. 280), No. 13, pp. 12896-901. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15695523
- Spudich, A.; Frigg, R.; Kilic, E.; Kilic, U.; Oesch, B.; Raeber, A.; Bassetti, C. L. and Hermann, D. M. (2005): Aggravation of ischemic brain injury by prion protein deficiency: role of ERK-1/-2 and STAT-1, *Neurobiol Dis* (vol. 20), No. 2, pp. 442-9. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15893468
- Sreenath, T.; Matrisian, L. M.; Stetler-Stevenson, W.; Gattoni-Celli, S. and Pozzatti, R. O. (1992): Expression of matrix metalloproteinase genes in transformed rat cell lines of high and low metastatic potential, *Cancer Res* (vol. 52), No. 18, pp. 4942-7. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1325287
- Stacey, D. W. and Kung, H. F. (1984): Transformation of NIH 3T3 cells by microinjection of Ha-ras p21 protein, *Nature* (vol. 310), No. 5977, pp. 508-11. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=6611509
- Stark, G. R.; Kerr, I. M.; Williams, B. R.; Silverman, R. H. and Schreiber, R. D. (1998): How cells respond to interferons, *Annu Rev Biochem* (vol. 67), pp. 227-64. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9759489
- Stokoe, D.; Campbell, D. G.; Nakielnny, S.; Hidaka, H.; Leever, S. J.; Marshall, C. and Cohen, P. (1992): MAPKAP kinase-2; a novel protein kinase activated by mitogen-activated protein kinase, *EMBO J* (vol. 11), No. 11, pp. 3985-94. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1327754
- Storm, S. M.; Cleveland, J. L. and Rapp, U. R. (1990): Expression of raf family proto-oncogenes in normal mouse tissues, *Oncogene* (vol. 5), No. 3, pp. 345-51. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1690378
- Sturgill, T. W.; Ray, L. B.; Erikson, E. and Maller, J. L. (1988): Insulin-stimulated MAP-2 kinase phosphorylates and activates ribosomal protein S6 kinase II, *Nature* (vol. 334), No. 6184, pp. 715-8. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3051111

- tion&list_uids=2842685
- Sun, H. B.; Zhu, Y. X.; Yin, T.; Sledge, G. and Yang, Y. C. (1998): MRG1, the product of a melanocyte-specific gene related gene, is a cytokine-inducible transcription factor with transformation activity, *Proc Natl Acad Sci U S A* (vol. 95), No. 23, pp. 13555-60. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9811838
- Svoboda, P.; Stein, P.; Hayashi, H. and Schultz, R. M. (2000): Selective reduction of dormant maternal mRNAs in mouse oocytes by RNA interference, *Development* (vol. 127), No. 19, pp. 4147-56. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10976047
- Sweetwyne, M. T.; Brekken, R. A.; Workman, G.; Bradshaw, A. D.; Carbon, J.; Siadak, A. W.; Murri, C. and Sage, E. H. (2004): Functional analysis of the matricellular protein SPARC with novel monoclonal antibodies, *J Histochem Cytochem* (vol. 52), No. 6, pp. 723-33. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15150281
- Takeuchi, M.; Shichinohe, T.; Senmaru, N.; Miyamoto, M.; Fujita, H.; Takimoto, M.; Kondo, S.; Katoh, H. and Kuzumaki, N. (2000): The dominant negative H-ras mutant, N116Y, suppresses growth of metastatic human pancreatic cancer cells in the liver of nude mice, *Gene Ther* (vol. 7), No. 6, pp. 518-26. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10757026
- Tchernitsa, O. I.; Sers, C.; Zuber, J.; Hinzmann, B.; Grips, M.; Schramme, A.; Lund, P.; Schwendel, A.; Rosenthal, A. and Schafer, R. (2004): Transcriptional basis of KRAS oncogene-mediated cellular transformation in ovarian epithelial cells, *Oncogene* (vol. 23), No. 26, pp. 4536-55. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15064704
- Teramoto, H.; Malek, R. L.; Behbahani, B.; Castellone, M. D.; Lee, N. H. and Gutkind, J. S. (2003): Identification of H-Ras, RhoA, Rac1 and Cdc42 responsive genes, *Oncogene* (vol. 22), No. 17, pp. 2689-97. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12730683
- Thony, B.; Auerbach, G. and Blau, N. (2000): Tetrahydrobiopterin biosynthesis, regeneration and functions, *Biochem J* (vol. 347 Pt 1), pp. 1-16. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10727395
- Tijsterman, M.; Ketting, R. F. and Plasterk, R. H. (2002): The genetics of RNA silencing, *Annu Rev Genet* (vol. 36), pp. 489-519. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12429701
- Tomari, Y.; Du, T.; Haley, B.; Schwarz, D. S.; Bennett, R.; Cook, H. A.; Koppetsch, B. S.; Theurkauf, W. E. and Zamore, P. D. (2004): RISC assembly defects in the *Drosophila* RNAi mutant armitage, *Cell* (vol. 116), No. 6, pp. 831-41. URL:

- http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15035985
- Tzivion, G.; Shen, Y. H. and Zhu, J. (2001): 14-3-3 proteins; bringing new definitions to scaffolding, *Oncogene* (vol. 20), No. 44, pp. 6331-8. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11607836
- Ui-Tei, K.; Naito, Y.; Takahashi, F.; Haraguchi, T.; Ohki-Hamazaki, H.; Juni, A.; Ueda, R. and Saigo, K. (2004): Guidelines for the selection of highly effective siRNA sequences for mammalian and chick RNA interference, *Nucleic Acids Res* (vol. 32), No. 3, pp. 936-48. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14769950
- Ullu, E.; Djikeng, A.; Shi, H. and Tschudi, C. (2002): RNA interference: advances and questions, *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* (vol. 357), No. 1417, pp. 65-70. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11839183
- Ussar, S. and Voss, T. (2004): MEK1 and MEK2, different regulators of the G1/S transition, *J Biol Chem* (vol. 279), No. 42, pp. 43861-9. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15284233
- Vallone, D.; Battista, S.; Pierantoni, G. M.; Fedele, M.; Casalino, L.; Santoro, M.; Viglietto, G.; Fusco, A. and Verde, P. (1997): Neoplastic transformation of rat thyroid cells requires the junB and fra-1 gene induction which is dependent on the HMGI-C gene product, *EMBO J* (vol. 16), No. 17, pp. 5310-21. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9311991
- Van Aelst, L.; White, M. A. and Wigler, M. H. (1994): Ras partners, *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* (vol. 59), pp. 181-6. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7587068
- Vanhecke, D. and Janitz, M. (2004): High-throughput gene silencing using cell arrays, *Oncogene* (vol. 23), No. 51, pp. 8353-8. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15517016
- Visvanathan, K. V.; Pocock, R. D. and Summerhayes, I. C. (1988): Preferential and novel activation of H-ras in human bladder carcinomas, *Oncogene Res* (vol. 3), No. 1, pp. 77-86. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3144694
- Vojtek, A. B.; Hollenberg, S. M. and Cooper, J. A. (1993): Mammalian Ras interacts directly with the serine/threonine kinase Raf, *Cell* (vol. 74), No. 1, pp. 205-14. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8334704
- Volmat, V.; Camps, M.; Arkinstall, S.; Pouyssegur, J. and Lenormand, P. (2001): The nucleus, a site for signal termination by sequestration and inactivation of p42/p44 MAP kinases, *J Cell Sci* (vol. 114), No. Pt 19, pp. 3433-43. URL:

- http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11682603
- Volmat, V. and Pouyssegur, J. (2001): Spatiotemporal regulation of the p42/p44 MAPK pathway, *Biol Cell* (vol. 93), No. 1-2, pp. 71-9. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11730325
- von Lintig, F. C.; Dreilinger, A. D.; Varki, N. M.; Wallace, A. M.; Casteel, D. E. and Boss, G. R. (2000): Ras activation in human breast cancer, *Breast Cancer Res Treat* (vol. 62), No. 1, pp. 51-62. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10989985
- Voorhoeve, P. M. and Agami, R. (2003): The tumor-suppressive functions of the human INK4A locus, *Cancer Cell* (vol. 4), No. 4, pp. 311-9. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14585358
- Wang, H. G.; Rapp, U. R. and Reed, J. C. (1996): Bcl-2 targets the protein kinase Raf-1 to mitochondria, *Cell* (vol. 87), No. 4, pp. 629-38. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8929532
- Wang, N. and Stamenovic, D. (2000): Contribution of intermediate filaments to cell stiffness, stiffening, and growth, *Am J Physiol Cell Physiol* (vol. 279), No. 1, pp. C188-94. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10898730
- Warne, P. H.; Vician, P. R. and Downward, J. (1993): Direct interaction of Ras and the amino-terminal region of Raf-1 in vitro, *Nature* (vol. 364), No. 6435, pp. 352-5. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8332195
- Waskiewicz, A. J.; Flynn, A.; Proud, C. G. and Cooper, J. A. (1997): Mitogen-activated protein kinases activate the serine/threonine kinases Mnk1 and Mnk2, *EMBO J* (vol. 16), No. 8, pp. 1909-20. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9155017
- Watanabe, T.; Shinohara, N.; Sazawa, A.; Kobayashi, Y.; Ogiso, Y.; Kimura, T.; Takiguchi, M.; Yasuda, J.; Hashimoto, A.; Koyanagi, T. and Kuzumaki, N. (2000): Suppressive effects of dominant negative ras mutant N116Y on transformed phenotypes of human bladder cancer cells, *Cancer Lett* (vol. 149), No. 1-2, pp. 195-202. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10737724
- Webb, C. P.; Van Aelst, L.; Wigler, M. H. and Woude, G. F. (1998): Signaling pathways in Ras-mediated tumorigenicity and metastasis, *Proc Natl Acad Sci U S A* (vol. 95), No. 15, pp. 8773-8. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9671754
- Weber, C. K.; Slupsky, J. R.; Kalmes, H. A. and Rapp, U. R. (2001): Active Ras induces heterodimerization of cRaf and BRaf, *Cancer Res* (vol. 61), No. 9, pp. 3595-8. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11488888

- tion&list_uids=11325826
- Weber, J. D.; Raben, D. M.; Phillips, P. J. and Baldassare, J. J. (1997): Sustained activation of extracellular-signal-regulated kinase 1 (ERK1) is required for the continued expression of cyclin D1 in G1 phase, *Biochem J* (vol. 326 (Pt 1)), pp. 61-8. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9337851
- Wei, W.; Jobling, W. A.; Chen, W.; Hahn, W. C. and Sedivy, J. M. (2003): Abolition of cyclin-dependent kinase inhibitor p16Ink4a and p21Cip1/Waf1 functions permits Ras-induced anchorage-independent growth in telomerase-immortalized human fibroblasts, *Mol Cell Biol* (vol. 23), No. 8, pp. 2859-70. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12665584
- White, M. A.; Nicolette, C.; Minden, A.; Polverino, A.; Van Aelst, L.; Karin, M. and Wigler, M. H. (1995): Multiple Ras functions can contribute to mammalian cell transformation, *Cell* (vol. 80), No. 4, pp. 533-41. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7867061
- Wianny, F. and Zernicka-Goetz, M. (2000): Specific interference with gene function by double-stranded RNA in early mouse development, *Nat Cell Biol* (vol. 2), No. 2, pp. 70-5. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10655585
- Wisdom, R. (1999): AP-1: one switch for many signals, *Exp Cell Res* (vol. 253), No. 1, pp. 180-5. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10579922
- Wojnowski, L.; Stancato, L. F.; Larner, A. C.; Rapp, U. R. and Zimmer, A. (2000): Overlapping and specific functions of Braf and Craf-1 proto-oncogenes during mouse embryogenesis, *Mech Dev* (vol. 91), No. 1-2, pp. 97-104. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10704835
- Wojnowski, L.; Zimmer, A. M.; Beck, T. W.; Hahn, H.; Bernal, R.; Rapp, U. R. and Zimmer, A. (1997): Endothelial apoptosis in Braf-deficient mice, *Nat Genet* (vol. 16), No. 3, pp. 293-7. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9207797
- Wu, X.; Noh, S. J.; Zhou, G.; Dixon, J. E. and Guan, K. L. (1996): Selective activation of MEK1 but not MEK2 by A-Raf from epidermal growth factor-stimulated Hela cells, *J Biol Chem* (vol. 271), No. 6, pp. 3265-71. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8621729
- Yan, J.; Roy, S.; Apolloni, A.; Lane, A. and Hancock, J. F. (1998): Ras isoforms vary in their ability to activate Raf-1 and phosphoinositide 3-kinase, *J Biol Chem* (vol. 273), No. 37, pp. 24052-6. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9727023

- Yang, S. H.; Sharrocks, A. D. and Whitmarsh, A. J. (2003): Transcriptional regulation by the MAP kinase signaling cascades, *Gene* (vol. 320), pp. 3-21. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14597384
- Yeung, K.; Seitz, T.; Li, S.; Janosch, P.; McFerran, B.; Kaiser, C.; Fee, F.; Katsanakis, K. D.; Rose, D. W.; Mischak, H.; Sedivy, J. M. and Kolch, W. (1999): Suppression of Raf-1 kinase activity and MAP kinase signalling by RKIP, *Nature* (vol. 401), No. 6749, pp. 173-7. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10490027
- Yoshinari, K.; Miyagishi, M. and Taira, K. (2004): Effects on RNAi of the tight structure, sequence and position of the targeted region, *Nucleic Acids Res* (vol. 32), No. 2, pp. 691-9. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14762201
- Yuryev, A.; Ono, M.; Goff, S. A.; Macaluso, F. and Wennogle, L. P. (2000): Isoform-specific localization of A-RAF in mitochondria, *Mol Cell Biol* (vol. 20), No. 13, pp. 4870-8. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10848612
- Zajchowski, D. A.; Bartholdi, M. F.; Gong, Y.; Webster, L.; Liu, H. L.; Munishkin, A.; Beauheim, C.; Harvey, S.; Ethier, S. P. and Johnson, P. H. (2001): Identification of gene expression profiles that predict the aggressive behavior of breast cancer cells, *Cancer Res* (vol. 61), No. 13, pp. 5168-78. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11431356
- Zhang, D.; Simmen, R. C.; Michel, F. J.; Zhao, G.; Vale-Cruz, D. and Simmen, F. A. (2002): Secretory leukocyte protease inhibitor mediates proliferation of human endometrial epithelial cells by positive and negative regulation of growth-associated genes, *J Biol Chem* (vol. 277), No. 33, pp. 29999-30009. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12023969
- Zhang, H.; Kolb, F. A.; Brondani, V.; Billy, E. and Filipowicz, W. (2002): Human Dicer preferentially cleaves dsRNAs at their termini without a requirement for ATP, *EMBO J* (vol. 21), No. 21, pp. 5875-85. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12411505
- Zhang, J.; Zhou, B.; Zheng, C. F. and Zhang, Z. Y. (2003): A bipartite mechanism for ERK2 recognition by its cognate regulators and substrates, *J Biol Chem* (vol. 278), No. 32, pp. 29901-12. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12754209
- Zhang, Y.; Mukhopadhyay, T.; Donehower, L. A.; Georges, R. N. and Roth, J. A. (1993): Retroviral vector-mediated transduction of K-ras antisense RNA into human lung cancer cells inhibits expression of the malignant phenotype, *Hum Gene Ther* (vol. 4), No. 4, pp. 451-60. URL:

- http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8399492
- Zhao, Y.; Neltner, B. S. and Davis, H. W. (2000): Role of MARCKS in regulating endothelial cell proliferation, *Am J Physiol Cell Physiol* (vol. 279), No. 5, pp. C1611-20. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11029309
- Zhao, Z.; Tan, Z.; Diltz, C. D.; You, M. and Fischer, E. H. (1996): Activation of mitogen-activated protein (MAP) kinase pathway by pervanadate, a potent inhibitor of tyrosine phosphatases, *J Biol Chem* (vol. 271), No. 36, pp. 22251-5. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8703041
- Zheng, C. F. and Guan, K. L. (1993): Properties of MEKs, the kinases that phosphorylate and activate the extracellular signal-regulated kinases, *J Biol Chem* (vol. 268), No. 32, pp. 23933-9. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8226933
- Zhou, X.; Benson, K. F.; Ashar, H. R. and Chada, K. (1995): Mutation responsible for the mouse pygmy phenotype in the developmentally regulated factor HMGI-C, *Nature* (vol. 376), No. 6543, pp. 771-4. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7651535
- Ziauddin, J. and Sabatini, D. M. (2001): Microarrays of cells expressing defined cDNAs, *Nature* (vol. 411), No. 6833, pp. 107-10. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11333987
- Zlotnik, A. (2004): Chemokines in neoplastic progression, *Semin Cancer Biol* (vol. 14), No. 3, pp. 181-5. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15246053
- Zuber, J.; Tchernitsa, O. I.; Hinzmann, B.; Schmitz, A. C.; Grips, M.; Hellriegel, M.; Sers, C.; Rosenthal, A. and Schafer, R. (2000): A genome-wide survey of RAS transformation targets, *Nat Genet* (vol. 24), No. 2, pp. 144-52. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10655059

Anhang

Tabelle 4

Genname	NM-Nummer	A-Raf	Mek2
Lox	NM_010728	0,365	0,23
Colla2	NM_007743	1,989	1,78
Sparc	NM_009242	0	0,32
Timp3	NM_011595	2,028	2,11
Slpi	NM_011414	0,105	0,42
Actx	NM_007393	3,399	2,23
Clic1	NM_033444	2,28	1,995
Vim	NM_011701	2,967	2,411
Prnp	NM_011170	2,215	2,77
C78120	n.b.	3,347	3
BF388816	n.b.	2,563	2,274
MMIAPIIB	n.b.	1,99	2,116
Odc	NM_013614	2,388	3,013
Lec-a	n.b.	2,786	3,21
Gch	NM_008102	2,195	3,2
Ctps2	NM_018737	2,698	2,217
Ccrn4l	NM_009834	2,196	2,74
mKIAA1294	n.b.	2,339	2,12
BY763212	n.b.	2,408	1,979

Tabelle 5

Gencode	NM-Nummer	Mek1+2 72h	Erk1+2	U0126 48h
Clic1	NM_033444	1,863	2,162	2,511
Cend1	NM_007631	4,029	2,619	2,326
Pi4k2b	NM_025951	1,871	2,77	2,072
BC018188	n.b.	1,866	2,89	3,092
Dusp4	NM_176933	2,087	2,263	2,666
Ank	NM_020332	1,925	2,732	2,356
Cap1	NM_007598	1,765	2,549	2,531
Ctsl	NM_009984	1,959	3,542	2,874
BF388816	n.b.	3,136	2,12	2,678
Plf	NM_031191	1,743	3,871	3,67
Tmsb4x	NM_021278	2,262	3,322	2,575
Odc	NM_013614	5,277	3,187	3,29
Gch	NM_008102	2,698	3,12	3,528
Ctps2	NM_018737	2,325	3,12	2,242
Itgb7	NM_013566	3,019	2,706	5,026
BM114666	n.b.	2,022	2,36	4,585
mKIAA1294	n.b.	2,933	3,342	1,891
Lox	NM_010728	0,213	0,17	0,145
Fgf7	NM_008008	0,383	0,145	0,194
Gopc	NM_053187	0,285	0,243	0,362
SST3	n.b.	0,193	0,25	0,481
Pmp22	NM_008885	0,157	0,36	0,471
Ltbp2	NM_013589	0,323	0,253	0,297
Col1a2	NM_007743	0,26	0,45	0,098
1200016B17Rik	n.b.	0,303	0,4	0,216
BM2329278	n.b.	0,364	0,36	0,323
Slpi	NM_011414	0,146	0,47	0,162
Man2a1	NM_008549	0,191	0,34	0,341
Mrg1	NM_010825	0,216	0,12	0,272
Cst3	NM_009976	0,425	0,44	0,341
BG092549	n.b.	0,373	0,213	0,343

Tabelle 6

Gencode	NM-Nummer	U0126 48h
Fbln5	NM_011812	0,305
Cxcl5	NM_009141	0,381
Cyr61	NM_010516	0,346
Acta2	NM_007392	0,357
Elp3	NM_028811	0,465
ESTAK018112	n.b.	0,465
Wisp2	NM_016873	0,412
ESTAL441963	n.b.	0,335
Mapk6	NM_015806	3,125
Pitx1	NM_011097	2,14
Rtn3	NM_053076	2,405
Arl10c	CT010337	2,976
Tfg	NM_019678	2,583
Bloc1s2	n.b.	2,433
ESTAK013938	n.b.	2,134
Grn	NM_008175	3,206
Gpnmb	NM_053110	3,8

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Reinhold Schäfer, der mir die Möglichkeit gegeben hat, in seinem Labor zu arbeiten und diese Arbeit fertig zu stellen. Ihm und Privatdozentin Christine Sers bin ich für die immer konstruktiven Diskussionen, hilfreichen Ratschläge und ihr stetes Interesse an meiner Thematik sehr dankbar. Außerdem möchte ich mich dafür bedanken, dass ich wissenschaftliche Tagungen im Aus- und Inland besuchen konnte.

Christine Sers möchte ich außerdem für die Korrektur dieser Arbeit danken.

Ich danke Herrn Professor Hans-Peter Herzel für die Betreuung meiner Doktorarbeit an der Humboldtuniversität zu Berlin und der Hilfe bei bürokratischen Problemen.

Herrn Doktor Matthias Truss bin ich für die Bereitstellung von siRNA Duplexen und seine vielen hilfreichen Ratschläge bei den kleinen Tücken des Laboralltags sehr dankbar.

Katrin „Katrinschen“ Barth möchte ich für die Hilfe bei diversen Westernblots danken und das sie meine „sensible“ Seite offenbart hat.

Anita Geflitter und Oleg Tchernitsa danke ich für die Hybridisierung und Auswertung der Microarrays.

Ganz besonders herzlich möchte ich mich bei „meinen Mädels“ Katrin Barth, Cornelia Gieseler, Anita Geflitter, Minh-Cam Ha-Thi, Jana Keil, Berit Lenz, Maryam Sheykholeslami und Constanze Zeller bedanken, die mir immer mit Rat und Tat zur Seite standen und für eine super Arbeitsatmosphäre gesorgt haben.

Bei Maryam Sheykholeslami möchte ich mich zusätzlich dafür bedanken, dass sie mir in den 4 Jahren gezeigt hat, dass es auch Sekretärinnen gibt, die nicht launisch sind.

Der ganzen Arbeitsgruppe Schäfer/ Sers möchte ich für das nette Arbeitsklima danken.

Meinem Freund Florian Ewert danke ich von ganzem Herzen für seine engelsgleiche Geduld mit einer manchmal etwas launischen Doktorandin, seine liebevolle Unterstützung auch in schwierigen Phasen der Arbeit, und seine manchmal etwas kontraproduktiven aber lieb gemeinten Motivationsversuche in den letzten Jahren.

Meinem kleinen Spatz Philipp danke ich dafür, dass er mir seit mehr als einem Jahr gezeigt hat, was im Leben wirklich wichtig ist und mit seinem Lachen alle kleinen Sorgen vergessen macht.

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Oberhausen, den 11.08.2006

Anja Schramme